

Aus dem Institut für Klinische Zytobiologie und Zythopathologie
Direktor: Prof. Dr. Roland Lill
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Galectin-3: Endozytose und Recycling in polaren Epithelzellen sowie seine Rolle im klarzelligen Nierenzellkarzinom



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Tamara Straube
aus Gießen

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 10.01.2014.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Ralf Jacob

1. Korreferent: PD. Dr. Jude Przyborski

1	Zusammenfassung	8
	Summary	10
2	Einleitung	12
2.1	<i>Das Epithel</i>	12
2.2	<i>Das primäre Zilium</i>	14
2.3	<i>Polarisierter Proteintransport</i>	15
2.3.1	Sortierprozesse	15
2.3.2	Lipid-Mikrodomänen	21
2.3.3	Endozytose und endosomale Kompartimente	23
2.4	<i>Galectin-3</i>	25
2.4.1	Die Familie der Galectine	25
2.4.2	Galectin-3	26
2.4.3	Sekretion und Endozytose von Galectin-3	27
2.5	<i>Nierenzellkarzinome</i>	30
2.5.1	Aufbau des renalen Tubulussystems	30
2.5.2	Klassifikation der Nierenzellkarzinome	32
2.5.3	Galectin-3 und das klarzellige Nierenzellkarzinom	37
2.6	<i>Weitere Proteine der Arbeit</i>	38
2.6.1	CEACAM1	38
2.6.2	p75-Neurotrophinrezeptor (p75 ^{NT^R})	39
2.6.3	gp80	40
2.6.4	CD29	41
3	Material und Methoden	44
3.1	<i>Geräte</i>	44
3.2	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	46
3.3	<i>Allgemeine Puffer</i>	48
3.4	<i>Zellkultur</i>	48
3.4.1	Verwendete Zelllinien	48
3.4.2	Auflistung Zelllinien	50
3.4.3	Kultivierung	51
3.4.4	Passage	51
3.4.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen	52

3.4.6	RNA-Interferenz	52
3.5	<i>Allgemeine proteinbiochemische Methoden</i>	54
3.5.1	Herstellung von Zelllysaten	54
3.5.2	Herstellung von Gewebelysaten	55
3.5.3	TCA/Aceton Fällung	55
3.5.4	Proteinbestimmung mit DC Protein Assay	56
3.5.5	SDS-PAGE	56
3.5.6	Western-Blot	57
3.5.7	Verwendete Antikörper	59
3.5.8	Coomassiefärbung R-250	60
3.5.9	TGN-Exit	60
3.6	<i>Spezielle Proteinbiochemische Methoden</i>	61
3.6.1	Herstellung von rekombinantem Galectin-3	61
3.6.2	Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten Proteinen	63
3.6.3	Herstellung einer Affinitätssäule mit rekombinantem Galectin-3	64
3.6.4	Isolierung von Galectin-3 Bindungspartnern aus RC-124 und RCC-FG1 Zellen	66
3.6.5	Oberflächenbiotinylierung	67
3.6.6	Co-Immunpräzipitation	69
3.6.7	Esi-MS/MS	71
3.6.8	Fluoreszenzpolarisation	71
3.7	<i>Zellbiologische Methoden</i>	73
3.7.1	Isolation von Zellkernen	73
3.7.2	Endozytose von rekombinanten Proteinen	74
3.7.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	75
3.7.4	DRM-Floating Analyse von MDCK II Zellen	76
3.7.5	NH ₄ Cl-Behandlung	79
3.7.6	Sekretionsassay und Oberflächenbiotinylierung	80
3.8	<i>Histologie</i>	81
3.8.1	Gewebeentnahme	81
3.8.2	Fixierung und Paraffineinbettung	81
3.8.3	Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten	82
3.8.4	Hämatoxilin-Eosin-Färbung	83
3.8.5	Azan-Färbung	83

3.9	<i>Immunfluoreszenz</i>	84
3.9.1	Immunfluoreszenzfärbung am Gewebe	85
3.9.2	Immunfluoreszenzfärbung an Zellen	85
3.9.3	Immunfluoreszenzfärbung für die GSDIM-Mikroskopie	86
3.9.4	Vorbereitung von Zellen ohne Immunfluoreszenzfärbung	86
3.9.5	Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper	87
3.10	<i>Fluoreszenzmikroskopische Anwendungen</i>	87
3.10.1	Lebendzellbeobachtung	87
3.10.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	88
3.10.3	GSDIM (ground state depletion microscopy followed by individual	89
3.11	<i>Transmissionselektronenmikroskopische Methoden</i>	91
3.11.1	Probenpräparation	91
3.12	<i>Statistik</i>	93
4	Ergebnisse	94
4.1	<i>Galectin-3 und das klarzellige Nierenzellkarzinom</i>	94
4.1.1	Klassifikation der Patientenproben	95
4.1.2	Histologie des Nierengewebes und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	96
4.1.3	Ultrastruktur der Niere und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	98
4.1.4	Renale Zellen des distalen Tubulus und Sammelrohres exprimieren Galectin-3	100
4.1.5	Erhöhte Expression von Galectin-3 im klarzelligen Nierenzellkarzinom	102
4.1.6	Untersuchung der Lokalisation und Expression von Galectin-3 Und apikalen sowie basolateralen Markerproteinen in RC-124 und RCC-FG1 Zellen	106
4.1.7	Nukleäre Akkumulation von Galectin-3 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen	110
4.1.8	Kolokalisation von Galectin-3 und Centrin-2 am Basalkörperchen des primären Ziliums	112
4.1.9	Das primäre Zilium bei der Entstehung klarzelliger Nierenzellkarzinome	113
4.1.10	Erniedrigte Expression von CEACAM1 in RCC-FG1 Zellen und im klarzelligen Nierenzellkarzinom	116

4.1.11	Einfluss der Tumordifferenzierung auf die Expression von CEACAM1 und Galectin-3	118
4.1.12	CEACAM1 und Galectin-3 interagieren im Übergangsgewebe	120
4.1.13	Identifikation von Galectin-3 Bindungspartnern	123
4.2	<i>Endozytose und Recycling von Galectin-3 an der apikalen Membran von Epithelzellen</i>	126
4.2.1	Endozytiertes Galectin-3 wird zurück an die Zelloberfläche transportiert	126
4.2.2	Galectin-3 wird in Flotillin-1 positiven Vesikeln endozytiert	129
4.2.3	Galectin-3 wechselt zwischen einem DRM-assoziierten und nicht-assoziierten Status	132
4.2.4	Die apikale Aufnahme von Galectin-3 ist abhängig vom pH-Wert	138
4.2.5	Rekombinantes Galectin-3 stellt die Sortierung des Neurotrophinrezeptors p75 wieder her	142
4.2.6	Die apikale Sortierung des Neurotrophinrezeptors p75 und die apikale Sekretion des löslichen Glykoproteins gp80 sind abhängig vom pH-Wert	146
4.3	<i>Einfluss des pH-Wertes auf die Ligandenbindung und Komplexbildung von Galectin-3</i>	153
4.3.1	Die Bindung von Galectin-3 an Lactosylsepharose-Beads erfolgt unabhängig vom pH-Wert	154
4.3.2	Die Bindung von Galectin-3 an 2`Fucosyllactose und A-Tetra erfolgt abhängig vom pH-Wert	155
4.3.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Oligomerisierung von Galectin-3	156
5	Diskussion	160
5.1	<i>Galectin-3 und das klarzellige Nierenzellkarzinom</i>	160
5.1.1	Das klarzellige Nierenzellkarzinom	160
5.1.2	Lokalisation und Expression apikaler und basolateraler Markerproteine in der Niere und dem klarzelligen Nierenzellkarzinom	161
5.1.3	Lokalisation und Expression von Galectin-3 im klarzelligen Nierenzellkarzinom	164
5.1.4	Nukleäre Akkumulation von Galectin-3	168
5.1.5	Kolokalisation von Galectin-3 und Centrin-2 am Basalkörperchen des primären Ziliums	170

5.1.6	Korrelation der Expression von Galectin-3 mit CEACAM1	172
5.1.7	Galectin-3 Bindungspartner in der Tumorentstehung	175
5.2	<i>Endozytose und Recycling von Galectin-3 an der apikalen Membran von Epithelzellen</i>	177
5.2.1	Apikales Recycling von Galectin-3	177
5.2.2	Endozytose von Galectin-3	178
5.2.3	Abhängigkeit der p75 ^{NTR} Sortierung von Galectin-3	182
5.2.4	Einfluss des pH-Wertes auf die Sortierung von p75 ^{NTR} und die Sekretion von gp80	183
5.3	<i>Einfluss des pH Wertes auf die Galectin-3 Ligandenbindung und Komplexbildung</i>	186
5.3.1	Einfluss des pH-Wert auf die Ligandenbindung	186
5.3.2	Einfluss des pH-Wert auf die Komplexbildung	188
5.4	<i>Modell zur Endozytose und Rezyklisierung von Gal-3</i>	189
6	Literaturverzeichnis	191
7	Anhang	219
7.1	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	219
7.2	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	222
7.3	<i>Publikationen</i>	225
7.4	<i>Poster</i>	226
7.5	<i>Verzeichnis der Akademischen Lehrer</i>	227
7.8	<i>Danksagung</i>	228

1 Zusammenfassung

Polare Epithelzellen stellen die Voraussetzung für ein funktionierendes Organ, wie z.B die Niere, dar. Sie bilden ein Monolayer an der Organaußenseite, das als Barriere gegen die Umwelt fungiert aber auch als Austauschsystem mit der Umwelt dient. Die polarisierte Struktur einer Epithelzelle ist durch eine apikale und basolaterale Membrandomäne charakterisiert. Diese Domänen sind durch *tight-junctions* voneinander separiert und unterscheiden sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung. Die Polarität der Zelle wird durch einen gerichteten Transport von Lipiden und Proteinen aufrechterhalten. Im apikalen Proteintransport existieren zwei Transportwege, die sich aufgrund der Affinität der darin transportierten Proteine zu *lipid rafts* in einen *raft* abhängigen und einen *raft* unabhängigen Transportweg untergliedern lassen. Die Trennung der Transportwege erfolgt in einem post-Golgi Kompartiment und beruht auf der Ausbildung hochmolekularer *cluster*, vermittelt durch den Sortierrezeptor Galectin-3.

Galectin-3 ist ein Galactose bindendes Lectin und fungiert als apikale Sortierplattform für *raft* unabhängige Glykoproteine. Es ist nicht nur intrazellulär präsent, sondern wird auch über einen unkonventionellen Sekretionsweg in den Extrazellulärraum transportiert. Von dort kann es vermutlich erneut in die Zelle aufgenommen werden wobei der Endozytosemechanismus noch ungeklärt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst mit Hilfe von biochemischen Analysen ein Rezyklierungsprozess von endozytiertem rekombinantem Galectin-3 beobachtet werden. Mit Hilfe von TGN-Exit Analysen und anschließender DRM-Isolation konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 60 min nach TGN-Block im Extrazellulärraum vorliegt und bei Wiederaufnahme in die Zelle mit *lipid rafts* assoziiert. Ergebnisse der hochauflösenden Mikroskopie und die Verwendung eines *lipid raft* Inhibitors bestätigen eine *lipid raft* abhängige Endozytose von Galectin-3. Desweiteren konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass die Bindung von Galectin-3 an Zuckerreste auf der Zelloberfläche

eine entscheidende Rolle bei der Internalisierung spielt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Assoziation mit *lipid rafts* und die Internalisierung des Lectins pH-abhängig erfolgen.

Während seines Rezyklierungsprozesses passiert Galectin-3 mit seinen gebundenen Liganden verschiedene endosomale Kompartimente mit unterschiedlichen pH-Werten. In der vorliegenden Arbeit konnten erste Hinweise auf den Einfluss des pH-Wertes während des apikalen Proteintransportes des Neurotrophinrezeptors p75 und des Glykoproteins gp80 gesammelt werden. Zugleich konnten Anzeichen für eine pH-Abhängigkeit der durch Galectin-3 induzierten Bildung hochmolekularer *cluster* ermittelt werden.

Neben seiner Funktion als apikaler Sortierrezeptor ist Galectin-3 an zahlreichen weiteren zellulären Prozessen wie der Regulierung des Zellzyklus, der Zell-Zell-Adhäsion, der Apoptose und Angiogenese beteiligt. Aufgrund dieser Funktionen spielt es eine wichtige Rolle während der Tumorgenese in Nierenzellen. Unter Verwendung konfokaler Fluoreszenzmikroskopie von humanem Nierengewebe und klarzelligem Nierenzellkarzinomgewebe konnte Aufschluss über die Lokalisation von Galectin-3 sowie verschiedener apikaler und basolateraler Markerproteine gewonnen werden. Galectin-3 konnte im gesunden Nierengewebe in einzelnen Epithelzellen des distalen Tubulus und Sammelrohres lokalisiert werden. Im Tumorgewebe zeigt es eine diffusere Verteilung und ist vermehrt im Zellkern zu beobachten. Mit Hilfe biochemischer Analysen konnte festgestellt werden, dass die Expression des Lectins bei 75% der untersuchten Patienten im klarzelligem Nierenzellkarzinom im Vergleich zum normalen Gewebe ansteigt. Dieser Expressionsanstieg korreliert während der Tumordifferenzierung mit dem Rückgang der Expression des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls CEACAM1. Desweiteren konnten Interaktionspartner des Lectins während der Tumordifferenzierung mittels Galectin-3-Affinitätssäule identifiziert werden.

Summary

Polar epithelial cells are the prerequisite for a functional organ like the kidney. They build a monolayer on the outer surface of the organ forming a barrier and exchange system between the organ and its environment. The polarized structure of epithelial cells is characterized by apical and basolateral plasma membrane domains. These two membrane domains are separated by tight junctions and differ in their lipid and protein composition. The polarity of the cell is maintained by a directional transport of lipids and proteins to their target membrane. In apical protein transport the sorting pathways can be subdivided by the affinity of the transported protein to lipid rafts into a lipid raft dependent or independent pathway. The separation of the transport routes takes place in a post-Golgi compartment, based on the formation of high molecular clusters mediated by the sorting receptor galectin-3.

Galectin-3 is a galactose-binding lectin acting as an apical sorting platform for raft independent glycoproteins. It is not only present intracellularly but can also be transported via an unconventional secretory pathway into the extracellular space. Presumably it can be taken up from the extracellular space into the cell again, but the exact mechanism of endocytosis is still unclear. In the present study a recycling process of endocytosed recombinant human galectin-3 could be observed by biochemical analyses. By using TGN-Exit analyses followed by DRM-isolation it could be shown that galectin-3 is present in the extracellular space 60 min after TGN-block. During its resumption this lectin is obviously associated with lipid rafts. Results of high-resolution microscopy and the use of a lipid raft inhibitor confirmed a lipid raft dependent endocytosis of galectin-3. Furthermore the binding affinity of galectin-3 to sugar residues on the cell surface seems to play a pivotal role in internalization of the lectin. Additionally the association of galectin-3 with lipid rafts and the endocytosis occur in a pH-dependent manner. During the recycling process galectin-3 and its ligands pass different endosomal compartments with varying pH. Furthermore in the present work, first indications for the influence of the pH during apical protein transport

of the p75 neurotrophin receptor and the glycoprotein gp80 could be collected. At the same time evidence of a pH dependent galectin-3 induced cluster formation was determined.

Galectin-3 is involved in many cellular processes like cell cycle regulation, cell-cell adhesion, apoptosis and angiogenesis. Due to these functions it is possible that this lectin participates in tumor progression in renal cells. Confocal fluorescence microscopy of human renal tissue and clear cell renal cell carcinoma tissue were used to obtain new insights in the localization of galectin-3 as well as various apical and basolateral marker proteins. In normal kidney tissue galectin-3 can be observed in single epithelial cells in the distal tubules and collecting ducts while in tumor tissue the localization is diffuse and shifted into the cell Nukleus. The expression of galectin-3 increases in the tumor tissue compared to the normal kidney tissue in 75% of patients with clear cell renal cell carcinoma used in this study. This increase in protein expression during tumor differentiation correlates with the decrease in the expression of the cell-cell adhesion protein CEACAM1. Furthermore, some interaction partners of galectin-3 during tumor progression could be identified by using a galectin-3 affinity column.

2 Einleitung

2.1 Das Epithel

Das Epithel stellt die äußerste Grenze zwischen dem Innern eines multizellulären Organismus und seiner Umwelt dar und sorgt für eine topologische und physiologische Abgrenzung einzelner Bereiche innerhalb eines Organismus. Epithelien bedecken nicht nur die äußere Körperoberfläche sondern kleiden auch Körperhöhlen aus. Sie bilden dabei den ersten Schutz gegen Eindringlinge, wie Bakterien, Pilze und Viren. Gleichzeitig halten sie durch ihre selektive Permeabilität die Körperhomöostase aufrecht. Sie sorgen z.B. für die Aufnahme von Nährstoffen (Darm), für den Transport von Flüssigkeiten und Abfallprodukten sowie für die Hormonproduktion (Niere, Pankreas). Je nach Lokalisation und Funktion bestehen Epithelien aus einer oder mehreren Schichten. Aufgrund ihrer Funktionalität besitzen Epithelzellen eine interne Polarität. Ihre Zellmembran wird in eine apikale (dem Lumen zugewandte) sowie eine basale und laterale (der Basalmembran bzw. benachbarten Zellen zugewandte) Domäne unterteilt. Die laterale und basale Domäne werden aufgrund ihrer ähnlichen Zusammensetzung meist zur basolateralen Domäne zusammengefasst (Lodish, 2008; Ross, 2007). Die apikale Oberfläche ist oft durch Mikrovilli vergrößert. Adhäsionsmoleküle wie die Desmosomen, Hemidesmosomen und die *Zonula adherens* spielen bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Struktur eine entscheidende Rolle (Abb. 2.1). Sie bilden Membran-durchspannende Proteinkomplexe aus, die das Zytoskelett einer Epithelzelle mit Proteinkomplexen benachbarter Zellen verbindet und somit auch zur mechanischen Stabilität des Zellverbandes beitragen. Die *Zonula adherens* bildet dabei einen ringförmigen lateralen Komplex und die Desmosomen punktförmige Kontakte mit benachbarten Zellen, während die Hemidesmosomen mit Proteinen der Basallamina interagieren. Neben den adhäsiven Strukturen gibt es auch noch verschließende Strukturen wie die

tight-junctions (*Zonula occludens*). Neben der räumlichen Trennung der apikalen von der basolateralen Membrandomäne bilden sie auch eine Diffusionsbarriere und dichten den extrazellulären Spalt zwischen zwei Zellen ab. Dies wird überwiegend durch ein querverzweigtes Netzwerk von Occludin und Claudin erreicht (Lodish, 2008). Für den Austausch von kleineren Molekülen und Ionen zwischen benachbarten Zellen sind die *gap junctions* verantwortlich. Sie bestehen aus mehrfachen Kopien eines Connexin-Proteins, die sich zu einem Transmembrankanal zusammenlagern.

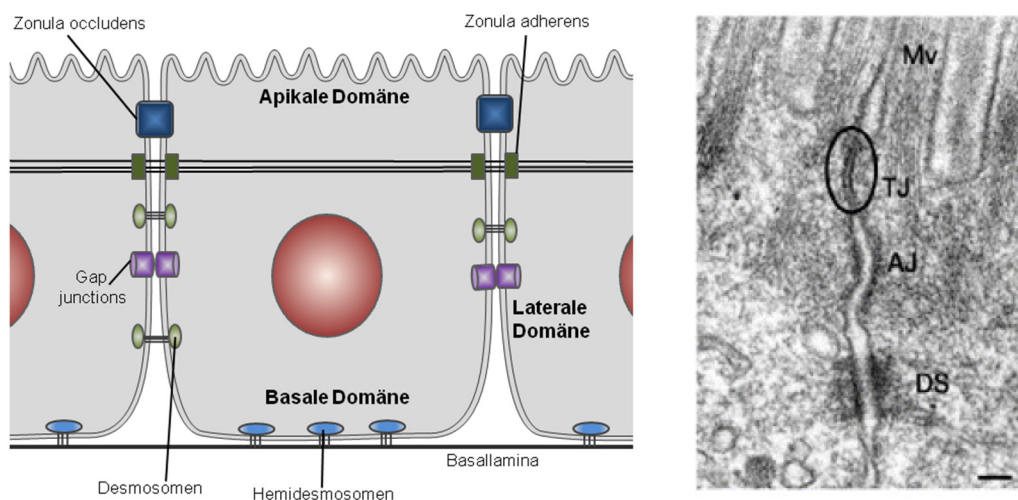


Abb. 2.1 Aufbau einer Epithelzelle

Mv, Mikrovilli; TJ, *tight junction*; AJ, *Adherens junction*; DS, Desmosomen
Elektronenmikroskopische Aufnahme (Tsukita *et al.*, 2001)

Beide Membrandomänen unterscheiden sich in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung. Die apikale Membran zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Cholesterol und Sphingolipiden aus, während die basolaterale Membran eine Anreicherung an Phosphatidylcholin aufweist (van Meer und Simons, 1988). Proteine, die mit sphingolipid- und cholesterinreichen Mikrodomänen, den *lipid rafts*, assoziieren, werden bevorzugt zur apikalen Zellmembran transportiert (Simons und Ikonen, 1997). Hierzu gehören z.B. Proteine, die über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit *lipid rafts* assoziiert sind. Auch andere Proteine zeigen anhand ihrer Verteilung die funktionelle Unterteilung der Membrandomänen. Proteine, die der Zelladhäsion

dienen, wie z.B. E-Cadherin oder β -Catenin, sind ausschließlich an der basolateralen Membran lokalisiert (Lock und Stow, 2005). Dagegen befinden sich z.B. die Verdauungsenzyme Saccharase-Isomaltase (SI) und die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) in Enterozyten, sowie Aquaporin-2 in den Hauptzellen der renalen Sammelrohre ausschließlich in der apikalen Zellmembran (Bedford *et al.*, 2003; Hauri *et al.*, 1985). Die Aufrechterhaltung der Polarität von Epithelzellen ist im Hinblick auf ihre zahlreichen Funktionen von essentieller Bedeutung und wird durch den polarisierten Transport innerhalb dieser Zellen aufrecht erhalten (siehe 2.3 *Polarisierter Proteintransport*).

2.2 Das primäre Zilium

Das primäre Zilium ist ein auf Mikrotubuli basierender, stabartiger, nicht-motiler Fortsatz auf der apikalen Oberfläche polarisierter Epithelzellen. Diese Form der Monozilien kommt z.B. in den Epithelzellen der Tubuli in der Niere, des Gallengangs und des Pankreas vor. Hier fungiert es als Mechanosensor und kontrolliert die Komposition von Flüssigkeiten und deren Flussgeschwindigkeit (Fliegaut *et al.*, 2007). Durch die von den Flüssigkeitsströmen ausgelösten Scherkräfte wird das primäre Zilium gebeugt und die Information wird über *Hedgehog*- und Wnt-Signalkaskaden in intrazelluläre Signale umgewandelt und weitergeleitet (Rohatgi *et al.*, 2007). Neben der sensorischen Funktion spielen sie auch eine entscheidende Rolle in der Zellpolarisation, wie bereits anhand von MDCK-Zellen gezeigt werden konnte (Bacallao *et al.*, 1989). Das primäre Zilium bildet sich während der Interphase des Zellzyklus. Dabei wird das Mikrotubulinetzwerk reorganisiert. Das MTOC wandert zum apikalen Zellkortex und bildet als sog. Basalkörperchen eine etwa 250 nm breite Basis für das Zilium (Bacallao *et al.*, 1989; Singla und Reiter, 2006). Im Innern des Basalkörperchens befindet sich die Zentriole, von der aus die Nukleation des Axonems, der strukturellen Kerneinheit des Ziliums, ausgeht. Da innerhalb des primären Ziliums keine Proteinneusynthese stattfindet, benötigt der Aufbau des

primären Ziliums einen bidirektionalen intraflagellaren Transport (IFT) von Proteinen, bei dem Motorproteine der Kinesin-2 Familie beteiligt sind (Rosenbaum und Witman, 2002). Das primäre Zilium ist eine komplexe Struktur, die aus mehr als 650 Proteinen bestehen kann. Am Grundgerüst des Basalkörperchens, bestehend aus neun Mikrotubuli (9+0), sind verschiedene Centrine angesiedelt. Sie sind essentielle Bestandteile des Basalkörperchens und gehören zur Calmodulin-Familie. Sie besitzen ein EF-Handmotiv, mit dem sie Ca^{2+} binden können. Durch die Ca^{2+} -Bindung wird eine Konformationsänderung induziert, die die Interaktion von Centrin mit anderen Proteinen reguliert (Salisbury, 2007). Zu den Interaktionspartnern zählen z.B. Tubulin und Galectin-3 (Koch *et al.*, 2010). Es existieren vier verschiedene Centrine im humanen Organismus. Centrin-2 und -3 werden ubiquitär exprimiert und reichern sich in centriolären und pericentriolären Bereichen bzw. am Basalkörper an (Laoukili *et al.*, 2000). Weitere Vertreter sind Centrin-1, welches nur in Keimzellen und der Retina vorkommt und Centrin-4, das nur in vollständig ausdifferenzierten Zellen exprimiert wird (Salisbury, 2007).

Diverse Krankheiten wie z.B. die Degeneration der Retina, polyzystische Nierenerkrankung, Hydrozephalus und Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) belegen die Bedeutung des primären Ziliums als essentielle Struktur der Zelle. Störungen der Ziliogenese und der Funktion des primären Ziliums bilden die Grundlage dieser Erkrankung (Fliege *et al.*, 2007; Nauli und Zhou, 2004).

2.3 Polarisierter Proteintransport

2.3.1 Sortierprozesse

Voraussetzung zur Aufrechterhaltung der zellulären Polarität ist ein gerichteter Transport von Lipiden und Proteinen zur apikalen bzw. basolateralen Domäne. Dieser Prozess basiert auf Sortiermotiven, die in der Struktur oder Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins codiert sind (Mellman und Nelson, 2008; Weisz und Rodriguez-Boulán, 2009). Im Fall des basolateralen Proteintransports befinden sich die Sortiersignale im zytoplasmatischen Bereich

des Proteins und bestehen aus kurzen Aminosäure-Sequenzen, die auf Dileucin (LL) oder Tyrosin-Motiven basieren wie NPXY oder YXX Φ (Tyrosin, zwei beliebige Aminosäuren, eine große hydrophobische Aminosäure) (Duffield *et al.*, 2008; Rodriguez-Boulan *et al.*, 2005). Manchmal reicht auch ein einziges Leucin als Sortiermotiv aus (Wehrle-Haller und Imhof, 2001). Basolaterale Sortiersignale weisen eine starke Ähnlichkeit zu Endozytosesignalen auf. Beide Motive werden durch Adapterproteinkomplexe, die an der Bildung von *clathrin coated pits* (CCP) beteiligt sind, erkannt. Dabei binden Proteine mit Tyrosin-Motiven bevorzugt an die γ 1-Untereinheit und Dileucin-Motive bevorzugt an die β 1-Untereinheit des AP1-Komplexes (Delacour und Jacob, 2006). Zudem konnte in AP1B-freie Zellen, gezeigt werden, dass durch Einführung des Adapterkomplex AP1B der Transport des LDL- und Transferrinrezeptors, der in diesen Zellen irrtümlicherweise zur apikalen Membran erfolgte, wieder zur basolateralen Membran korrigiert werden konnte (Folsch *et al.*, 1999).

Im Vergleich zum basolateralen Proteintransport sind die Sortiersignale für den apikalen Transport vielfältiger und sind noch unzureichend erforscht. Neben zytoplasmatischen Signalen existieren auch Motive im Transmembran- oder extrazellulären Bereich des Proteins (Schuck und Simons, 2004; Weisz und Rodriguez-Boulan, 2009). Bisher bekannte Sortiersignale sind posttranslationale N- und O-Glykosylierungen oder ein Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) (Vagin *et al.*, 2009). Diese Signale lassen eine Differenzierung des apikalen Sortierwegs in zwei weitere Routen zu, den *lipid raft* abhängigen und den *lipid raft* unabhängigen Sortierweg (Jacob *et al.*, 2003). Dabei sind Überschneidungen in diesen beiden Routen nicht ausgeschlossen, da ein Sortiersignal nicht zwangsläufig einem Weg unterliegt.

Lipid rafts sind Membranmikrodomänen und kommen in Epithelzellen meist in der apikalen Membran vor (siehe auch 2.3.2 *Lipid Mikrodomänen*). Sie zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Cholesterol, Sphingolipiden und ihrer Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien bei geringen Temperaturen aus. Einige Proteine erhalten im ER einen GPI-Anker, der sie in der Membran verankert und zur Assoziation mit *lipid rafts* führt (Brown und Rose, 1992). Diese Assoziation der Cargo-Proteine mit den Membranmikrodomänen findet

bereits im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) statt (Simons und Ikonen, 1997) und die Länge der Transmembrandomäne spielt dabei eine wichtige Rolle (Nezil und Bloom, 1992). Neben der Modifikation mit GPI-Ankern, bewirken auch intrinsische Signale die Assoziation von Proteinen mit *lipid rafts* (siehe 2.3.2 *Lipid-Mikrodomänen*). Die Assoziation mit *lipid rafts* ist kein allein ausschlaggebendes apikales Sortiersignal. Zum einen existieren auch GPI-verankerte Proteine in der basolateralen Membran, wie am Beispiel des GPI-verankerten Prionenproteins PrpC in MDCK Zellen gezeigt werden konnte (Sarnataro *et al.*, 2002). Zum anderen belegen Untersuchungen eine Sortierung von nicht *raft* Proteinen wie der LPH oder des Neurotrophinrezeptors p75^{NTR} zur apikalen Membran (Delacour *et al.*, 2006; Delacour und Jacob, 2006). Neben der Art des Sortiersignals und der Assoziation zu *lipid rafts* spielt der Transportmechanismus eine entscheidende Rolle. Dabei konnten in den letzten Jahren Hinweise auf die Abhängigkeit des apikalen Transports von der Ausbildung hoch-molekularer *cluster* gesammelt werden. Erst der Zusammenschluss GPI-verankerter Proteine und die Stabilisation hoch-molekularen *lipid raft cluster* führen zum apikalen Transport dieser Proteine (Paladino *et al.*, 2006; Paladino *et al.*, 2004). Bei der Oligomerisierung dieser *lipid raft* assoziierten Proteinen zu hochmolekularen Komplexen sind u.a. Lectine beteiligt. Galectin-4 konnte bereits als potentieller Kandidat im apikalen Transport von *lipid raft* abhängigen Proteinen identifiziert werden und eine Depletion dieses Lectins in Enterozyten verhindert die Bildung von *lipid raft clustern* (Delacour *et al.*, 2005). Galectin-3 fungiert stattdessen als apikaler Sortierrezeptor für nicht *raft* assoziierte Glykoproteine wie der LPH, p75^{NTR} und gp114. Ein *knock down* von Galectin-3 in MDCK Zellen oder Maus-Enterozyten führt zur Fehlsortierung dieser *raft* unabhängigen Proteine zur basolateralen Membran und zur verminderten Komplexbildung (Delacour *et al.*, 2006; Delacour *et al.*, 2007; Delacour *et al.*, 2008).

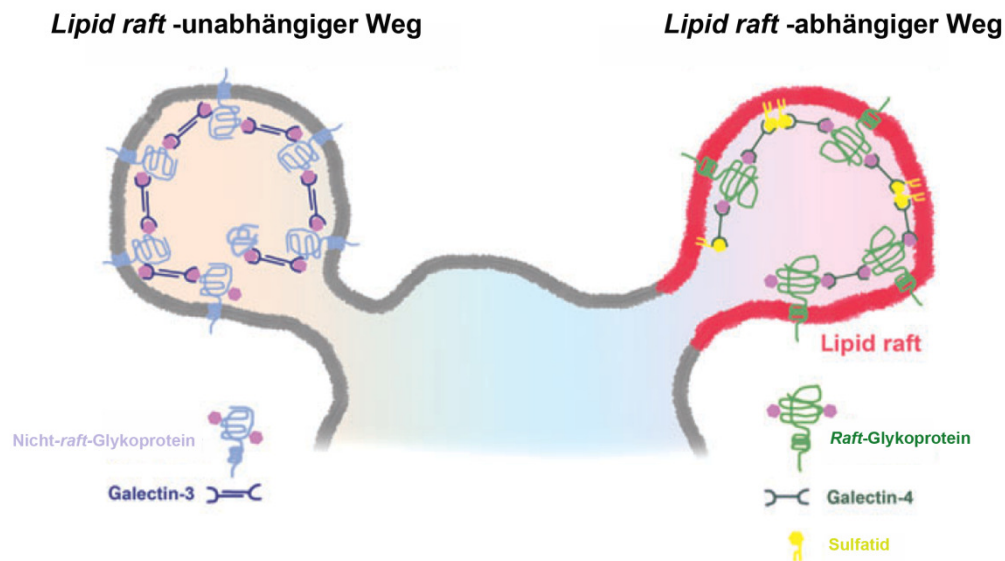


Abb. 2.2 Modell zur apikalen Sortierung *lipid raft* abhängiger und *lipid raft* unabhängiger Proteine

Galectin-3 bindet im Endosom nicht *raft* assoziierte Glykoproteine. Durch seine Multimerisierung bilden sich hochmolekulare *cluster*, die zur apikalen Membran transportiert werden. Galectin-4 bindet an Sulfatide (Glykosphingolipide) und stabilisiert dadurch *lipid rafts*. Durch die zusätzliche Bindung an *lipid raft* abhängige Glykoproteine werden auch hier Komplexe gebildet und zur apikalen Membran transportiert. (Delacour *et al.*, 2009)

Sowohl im *lipid raft* abhängigen als auch im *lipid raft* unabhängigen Sortierprozess spielt die Kreuzvernetzung der Cargoproteine eine entscheidende Rolle. Im ersten Fall ist Galectin-4 für die Verbindung von Glykoproteinen mit Glykosphingolipiden verantwortlich, während im zweiten Weg Galectin-3 durch die Kreuzvernetzung der Glykoproteine mit sich selbst eine apikale Sortierplattform schafft (Abb. 2.2). Die apikale Sortierung von nicht *raft* assoziierten Proteinen mit Hilfe von Galectin-3 beruht auf der Bindung von Galectin-3 an glykosylierte Aminosäuren dieser Proteine. (Breuza *et al.*, 2002). Dabei bewirkt Galectin-3 über die Bindung der Glykane durch seine CRD eine Quervernetzung der selben und induziert eine Membrankrümmung die letztendlich in der Abschnürung eines Vesikels endet (Delacour *et al.*, 2007; Delacour *et al.*, 2009). Die Beteiligung diverser Mantelproteine oder Dynamin-ähnlicher Proteine, wie es beim basolateralen Transport der Fall ist, ist noch

nicht geklärt. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Dynamin-2 an der Vesikelabschnürung von p75^{NTR} aus dem TGN beteiligt ist (Kreitzer *et al.*, 2000).

Bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen durch Zuckerketten unterscheidet man zwischen N- und O-Glykosylierungen, abhängig ob, die Kohlenhydratgruppe über die freie Säureamidgruppe eines Asparaginrestes (N-Glykosylierung) oder die Hydroxygruppe eines Serin- oder Threoninrestes (O-Glykosylierung) gebunden ist. Diese Glykosylierungen spielen im apikalen Proteintransport eine entscheidende Rolle. In mutierten MDCK-Zellen, die sich in ihrem Glykosylierungsmuster unterscheiden, kommt es zur Fehlsortierung apikaler Glykoproteine (Le Bivic *et al.*, 1993; Parczyk und Koch-Brandt, 1991) und die Deletion der stark O-glykosylierten Stabregion von p75^{NTR} führt zu einer basolateralen Fehlsortierung des normalerweise apikal lokalisierten Rezeptores (Yeaman *et al.*, 1997). Einige N-glykosylierte Proteine werden allerdings auch zur basolateralen Membran transportiert, was darauf hindeutet, dass basolaterale Sortiersignale dominant gegenüber apikalen sind (Jacob *et al.*, 1999; Simons und Ikonen, 1997).

Damit alle Proteine an ihren Bestimmungsort gelangen, gibt es verschiedene Transportwege innerhalb der Zelle (Abb. 2.3). Basolaterale Proteine werden bereits im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) durch einen Clathrin-abhängigen Mechanismus unter Beteiligung von Adapterproteinkomplexen von apikalen Proteinen getrennt (Deborde *et al.*, 2008; Gonzalez und Rodriguez-Boulan, 2009). Andere Sortierprozesse, wie die apikale Proteinsortierung, finden in einer Vielzahl von Endosomen statt und können auf unterschiedlichste Weise erfolgen. Wie anhand einiger Untersuchungen des Transportes von GPI-verankerten *green fluorescent protein* (GFP) Varianten beobachtet werden konnte, erfolgt der einfachste Weg vom TGN direkt zur apikalen Membran (Hua *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2001).

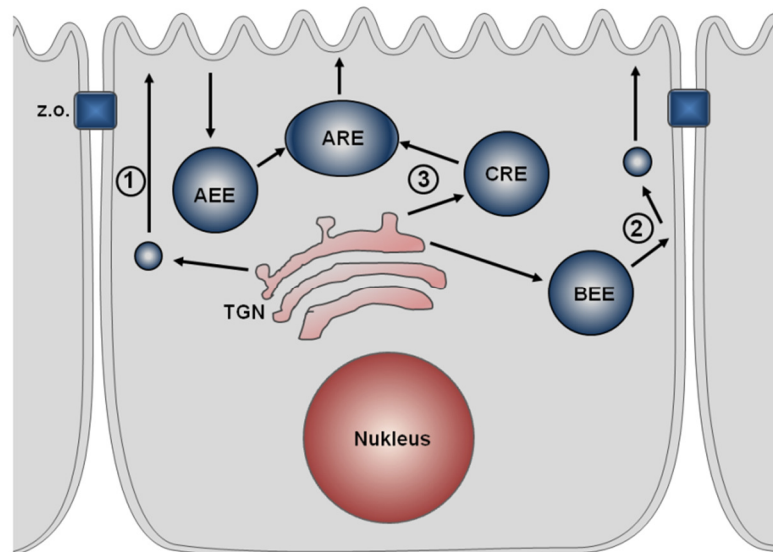


Abb. 2.3 Transportwege in polaren Zellen (vereinfachte Darstellung)

Apikale Proteine werden entweder vom TGN direkt zur apikalen Membran transportiert (1), gelangen über Transzytose zur apikalen Membran (2) oder passieren endosomale Kompartimente auf ihrem Weg (3). In den endosomalen Kompartimenten erfolgt auch die *lipid raft* abhängige und -unabhängige Sortierung der Cargoproteine. AEE, apikales frühes Endosom (*apical early endosome*); ARE, apikales Recycling Endosom (*apical recycling endosome*); CRE, gemeinsames Recycling Endosom (*common recycling endosome*); BEE, basolaterales frühes Endosom (*basolateral early endosome*); TGN, Trans-Golgi-Netzwerk; z.o., Zonula occludens.

Ein weiterer Weg vollzieht sich über Transzytose. Beispielsweise konnte in Hepatozyten festgestellt werden, dass einige apikal sezernierte Proteine zuerst zur basolateralen Membran transportiert werden bevor sie den apikalen Transportweg einschlagen (Bastaki *et al.*, 2002). Ebenfalls in MDCK-Zellen konnte auch für den IgA-Rezeptor eine apikale Sortierung nach Transzytose beobachtet werden (Mostov, 1994). Der dritte Weg der apikalen Sortierung erfolgt vom TGN über die endosomale Kompartimente, wie dem gemeinsamen Recycling Endosom (*common recycling endosome* (CRE)) und dem apikalen Recycling Endosom (ARE). Cramm-Behrens und Kollegen konnten bereits zeigen, dass die apikalen Proteine LPH und SI auf ihrem Weg zur Zytoplasmamembran Rab-4, Rab-8 und Rab-11 positive endosomale Kompartimente durchlaufen (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). In weiteren

Untersuchungen zu beiden Proteinen konnte festgestellt werden, dass nach Verlassen des TGN eine Trennung der *lipid raft* abhängigen SI von der *raft* unabhängigen LPH in unterschiedliche Vesikel erfolgt (Jacob und Naim, 2001). Bei diesem Post-Golgi-Kompartiment handelt es sich vermutlich um das ARE oder das CRE (Delacour *et al.*, 2006; Weisz und Rodriguez-Boulan, 2009).

2.3.2 Lipid-Mikrodomänen

Lipid-Mikrodomänen oder auch *lipid rafts* sind Membranmikrodomänen, in denen Cholesterol, Sphingolipide und Glykolipide angereichert sind (Simons und Ikonen, 1997). Sie tauchen hauptsächlich in der Plasmamembran auf, können aber auch in der Membran des Golgi-Apparats vorkommen. In der Literatur schwanken die Angaben über ihre Größe. Je nach Detektionsmethode finden sich Werte zwischen 10 - 200 nm (Jacobson *et al.*, 2007; Owen *et al.*, 2012; Simons und Ikonen, 1997). Methoden wie z.B. FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) und *single particle tracking* erlauben exaktere Messungen und weisen auf einen Durchmesser von 60 - 70 nm hin (Pralle *et al.*, 2000). Lipid-Mikrodomänen zeichnen sich durch eine sogenannte *liquid-ordered phase* aus, die neben dem hohen Anteil an Cholesterol und Sphingolipiden durch dicht gepackte Fettsäuren, eine hohe Schmelztemperatur und einer guten lateralen Mobilität der Lipide gekennzeichnet ist. Sie sind außerdem durch ihre Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien, wie Triton-X 100, bei 4 °C charakterisiert. Deshalb werden sie auch als Detergenz-resistente Mikrodomänen (DRMs) bezeichnet. Die Isolation von DRMs erfolgt anhand einer Dichtegradientenzentrifugation, d.h. eines Saccharose oder Nycodenzgradienten (Fiedler *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1973). Es wird postuliert, dass *lipid rafts* beim apikalen Proteintransport eine Rolle spielen indem sie stabile Sortierplattformen (*cluster*) bilden. Dabei kommt es im medialen Golgi zur Zusammenlagerung von vielen kleinen *raft* Domänen. Proteine und Lipide, die eine hohe Affinität zu den Lipid-Mikrodomänen aufweisen oligomerisieren mit Hilfe von Lectinen und Annexin-ähnlichen Proteinen und initiieren somit die Bildung von *lipid raft* Komplexen (Fullekrug und Simons, 2004; Schuck und

Simons, 2004). Das an Sulfatide bindende Galectin-4 konnte bereits als Komponente des apikalen *lipid raft* abhängigen Proteintransportes identifiziert werden (Delacour *et al.*, 2009). Interessanterweise kann die Komplexbildung auf unterschiedliche Art und Weise initiiert werden. Z.B. wird in T-Zellen die Komplexbildung erst durch die Interaktion des T-Zellrezeptors mit einem MHC-gebundenen Peptid auf einer Antigen-präsentierenden Zelle initiiert (Harder und Engelhardt, 2004). Zu den in *lipid rafts* angereicherten Proteinen gehören z.B. GPI-verankerte Proteine. Sie werden im Golgi-Apparat durch Erhalt ihres Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker in die Lipid-Mikrodomänen eingelagert. Dies konnte bereits in MDCK Zellen bestätigt werden (Lisanti *et al.*, 1989a; Lisanti *et al.*, 1989b). Neben den GPI-verankerten Proteinen sind auch bestimmte Transmembranproteine, wie die apikale sortierte Saccharase-Isomaltase (SI) und die Influenzaproteine Hämagglutinin (HA) oder Neuraminidase (NA) mit *lipid rafts* assoziiert (Alfalah *et al.*, 1999; Jacob *et al.*, 2000; Simons und Ikonen, 1997). Von letzteren ist bekannt, dass der Transmembranbereich für die Assoziation mit den Mikrodomänen und damit für den Transport zur apikalen Zellmembran verantwortlich ist (Kundu *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1998). Weitere Membranproteine der *lipid rafts* sind Caveolin und Flotillin, die an unterschiedlichen Endozytoseprozessen sind (siehe 2.3.3 *Endozytose und endosomale Kompartimente*). Neben ihrer Rolle im intrazellulären Proteintransport und der Endozytose, spielen sie auch eine Rolle in der Signalweiterleitung. In hämatopoetischen Zellen sind einige Rezeptoren wie z.B. der FcεRI, der auf der Zelloberfläche von basophilen Granulozyten, mit *lipid rafts* assoziiert. Die Bindung von IgE an diesen Rezeptor setzt eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang. Auch bei der Pathogenese diverser Krankheiten sind DRMs beteiligt. Sie dienen beispielsweise Shigatoxinen, Prionen und Choleratoxin als Eintrittspforte in die Wirtszelle (Brown und London, 1998).

2.3.3 Endozytose und endosomale Kompartimente

Als Endozytose bezeichnet man die Aufnahme von Substanzen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle. Dies geschieht unter Entstehung von Vesikeln durch Einstülpung und Abschnürung der Zellmembran. In Abhängigkeit vom vorliegenden Mechanismus unterscheidet man die Clathrin-abhängige Endozytose von der *lipid raft*-abhängigen Endozytose (Abb.2.4). Im erstgenannten Fall wird die Membraneinstülpung von einem Netzwerk aus Clathrinmolekülen ummantelt, worauf sich unter Mitwirkung von Adapterproteinen sog. *clathrin-coated pits* (CCP) bilden. Die Clathrin-abhängige Endozytose ist nicht mit *lipid rafts* assoziiert. Bekannte Beispiele sind die Aufnahme des Transferrin-Rezeptors (Tfn-R) oder des LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptors. Die *lipid raft*-abhängige Endozytose beinhaltet die Caveolae-abhängige Endozytose, die ähnlich wie die Ausbildung von CCP's von Mantelproteinen ausgeht. In diesem Fall aber befinden sich die Mantelproteine (Caveolin sowie Flotillin-1 und -2) in *lipid raft* Domänen auf der Zellmembran. Da beide Proteine nicht gleichzeitig in der Membran vorkommen, kann die Caveolae-abhängige Endozytose in zwei weitere Kategorien unterteilt werden (Glebov *et al.*, 2006; Hansen und Nichols, 2009). So werden z.B. GPI-verankerte Proteine über den Caveolin-abhängigen Weg aufgenommen, während das Simian Virus 40 über den Flotillin-abhängigen Mechanismus endozytiert wird (Damm *et al.*, 2005). Sowohl bei der Clathrin-abhängigen als auch bei der Caveolae-abhängigen Endozytose ist für die Abknospung der Vesikel Dynamin notwendig. Beide Endozytosemechanismen können durch bestimmte Chemikalien gehemmt werden. Beispielsweise hemmt Chlorpromazin die Clathrin-abhängige Endozytose während Filipin als Inhibitor der Caveolae-abhängigen Endozytose wirkt. (Ivanov, 2008).

Nach der Aufnahme des Materials und erfolgreicher Vesikelabschnürung gelangen die Cargoproteine als erstes in das frühe Endosom, dass durch die Markerproteine EEA1 und Rab4 gekennzeichnet ist (Duffield *et al.*, 2008). Von hier aus können die Proteine nun über das späte Endosom zur Degradation in das Lysosom gelangen oder werden wieder zur Plasmamembran zurück transportiert. Dies kann zum einen über das apikale, Rab11 positive Recycling-

Endosom geschehen oder die Proteine passieren erst das sogenannte *common recycling endosome* (CRE, nicht dargestellt) und gelangen dann über das apikale Recycling-Endosom zur Zellmembran zurück (Perret *et al.*, 2005).

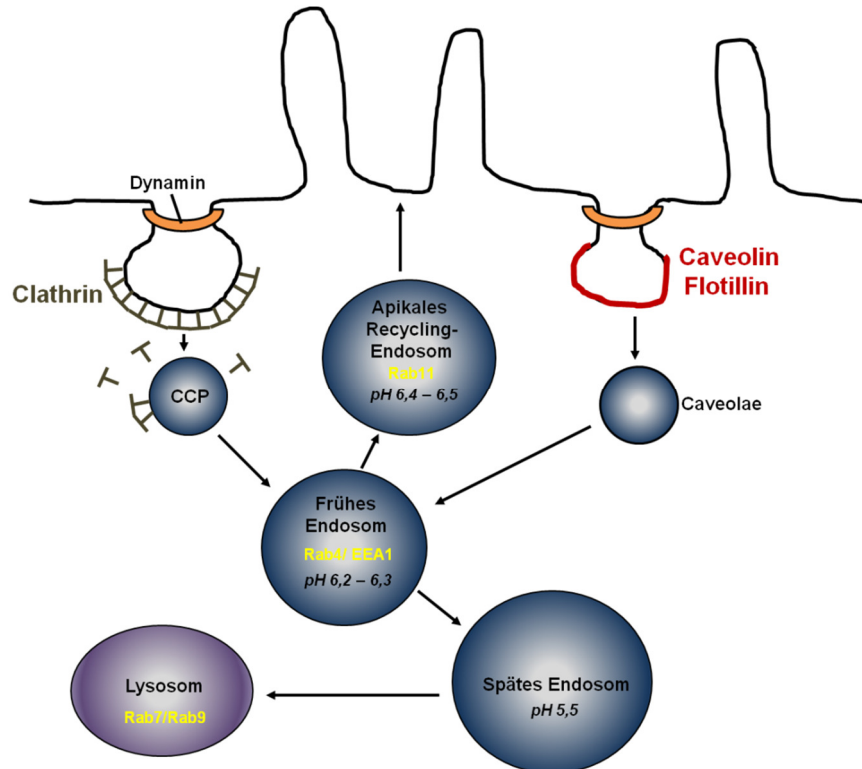


Abb. 2.4 Endozytosemechanismen und endosomale Kompartimente

Es gibt zwei verschiedene Arten von Endozytose. Bei der Clathrin-abhängigen Aufnahme bildet das Mantelprotein Clathrin eine käfigartige Struktur an der Zellmembran und das Protein wird über sogenannte *clathrin-coated pits* (CCP) aufgenommen. Beim *lipid raft*-abhängigen Aufnahmemechanismus erfolgen Zytoplasmaeinstülpungen in *lipid raft* Domänen (rot), die Caveolin oder Flotillin beinhalten. Für die Abknospungen von der Zellmembran ist in beiden Fällen Dynamin verantwortlich. Die aufgenommenen Proteine gelangen in das frühe Endosom. Von dort können sie entweder zur Degradation über das späte Endosom in das Lysosom gelangen, oder es findet mit Hilfe des apikalen Recycling-Endosoms ein Rezyklieren zur Zytoplasmamembran statt. Die einzelnen endosomalen Kompartimente können anhand charakteristischer Markerprotein, wie z.B. Rab4, 7, 9 und 11, identifiziert werden.

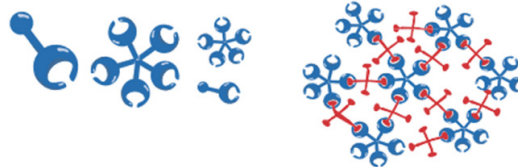
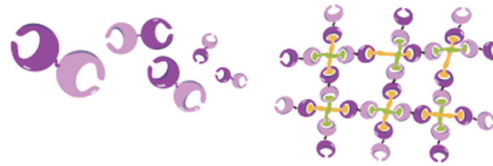
Endosomale Kompartimente spielen ebenfalls eine Rolle in Sortierprozessen auf dem Weg vom TGN zur apikalen Plasmamembran und im Recycling von Proteinen (Ang *et al.*, 2004; Rodriguez-Boulan *et al.*, 2005). Von den apikalen

Markerproteinen LPH und SI ist bekannt, dass sie Rab4, Rab8 und Rab11 positive Kompartimente auf ihrem Weg zur apikalen Zellmembran durchlaufen (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). Die endosomalen Kompartimente unterscheiden sich nicht nur anhand ihrer Markerproteine, sondern auch durch ihren pH-Wert. Dieser übt einen entscheidenden Einfluss auf die Endozytose und den Proteintransport von Proteinen aus, die diese Kompartimente passieren. Während an der Plasmamembran ein i.d.R. neutraler pH von 7,3 - 7,4 herrscht, besitzen die Endosomen einen leicht sauren pH, das frühe Endosom einen pH-Wert von 6,2 - 6,3, das späte Endosom von ~ 5,5 und das Recycling-Endosom von 6,4 - 6,5 (Casey *et al.*, 2010; Yamashiro und Maxfield, 1987).

2.4 Galectin-3

2.4.1 Die Familie der Galectine

Galectine gehören zur Familie der Lectine und zeichnen sich durch ihre hohe Affinität zu β -Galaktosiden und den Besitz einer konservierten Kohlenhydraterkennungsdomäne, der *carbohydrate recognition domain* (CRD), aus (Barondes *et al.*, 1994). Bisher existieren 15 bekannte Galectine in Säugetieren, die sich anhand ihrer Anzahl und Organisation der CRD in drei Gruppen einteilen lassen (Abb. 2.5). Der Galectin-Prototyp besitzt nur eine CRD und eine kurze N-terminalen Domäne (Abb. 2.5 A). Vertreter dieser Gruppe sind in der Lage Dimere zu bilden und können somit Proteine kreuzvernetzen. Der Tandem Repeat Typ besteht aus zwei CRDs mit leicht unterschiedlichen Bindungsspezifitäten, die über ein Linker-Peptid miteinander verbunden sind (Abb. 2.5 C). Der chimäre Typ zeichnet sich durch eine CRD aus, die über eine prolin- und glycinreiche Domäne mit einem N-Terminalen Schwanz, der u.a. der Multimerisierung dient, verknüpft ist (Abb. 2.5 B). Der einzige Vertreter dieser Gruppe ist Galectin-3 (Yang *et al.*, 2008).

A) Prototyp (Galectin-1, -2, -5, -10, -11, -13, -14, -15)**B) Chimärer Typ (Galectin-3)****C) Tandem-Repeat-Typ (Galectin-4, -6, -8, -9, -12)****Abb. 2.5 Mitglieder der Galectin-Familie**

Galectine lassen sich abhängig von ihrem Aufbau in drei Gruppen unterteilen. (A) Der Prototyp besitzt eine CRD und existiert häufig als Dimer. (B) Galectin-3 ist der einzige Vertreter des chimären Typs und zeichnet sich durch den Besitz einer CRD verbunden mit einer N-terminalen Multimerisierungsdomäne aus. Bei der Ligandenbindung kommt es oft zur Pentamerbildung. (C) Tandem-Repeat Typen der Galectine besitzen zwei CRDs über die sie ein Netzwerk mit Liganden bilden können (modifiziert nach (Yang *et al.*, 2008)).

2.4.2 Galectin-3

Galectin-3 ist ca. 30 kDa groß und wurde ursprünglich als Oberflächenantigen Mac-2 auf Maus-Makrophagen identifiziert (Ho und Springer, 1982). Die C-terminale CRD, mit der es galactosehaltige Glykane binden kann, besteht aus einer β -Sandwichkonfiguration (Hughes, 2001). Elf β -Stränge lagern sich in zwei β -Faltblättern zusammen. Die Zuckerbindungstasche besitzt fünf Bindungsstellen, die in A - E unterteilt werden, wobei die Bindungsstelle C die entscheidende β -Galactosid-Bindestelle ist (Leffler *et al.*, 2004). Die Bindung des Liganden erfolgt durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen mit den in der Bindungstasche befindlichen Aminosäuren His158, Asn160, Arg162, Asn174, Trp181, Glu184 (Diehl *et al.*, 2009; Saraboji *et al.*, 2012; Seetharaman *et al.*, 1998).

Neben seiner CRD besitzt Galectin-3 eine 110 - 130 Aminosäuren lange N-terminale Domäne, die nicht an der Bindung von Kohlenhydraten beteiligt ist, aber für die Multimerisation und den Transport des Lectins eine entscheidende Rolle spielt (Mehul *et al.*, 1994; Menon und Hughes, 1999). Mittlerweile sind zwei Mechanismen zur Multimerisierung von Galectin-3 bekannt. Die Komplexbildung kann sowohl N- als auch C-terminal vermittelt sein. Bei der N-terminalen Oligomerisierung bilden sich Lectin-Pentamere, bei denen die CRD zugänglich bleibt, während bei der C-terminalen Oligomerisierung sich die Lectine über ihre CRD aneinanderlagern (Ahmad *et al.*, 2004; Lepur *et al.*, 2012b). Diese sogenannten Galectin-3-*cluster* stellen eine wichtige Voraussetzung in der apikalen Sortierung von nicht-*raft* assoziierten Proteinen dar. Dies konnte mittels Untersuchungen zur Sortierung der apikalen Proteine p75^{NTR}, LPH und gp114 gezeigt werden (Delacour *et al.*, 2006; Delacour *et al.*, 2007). Diese Komplexbildung konnte in apikalen Transportvesikeln mit *lipid raft* assoziierten Proteinen nicht nachgewiesen werden. Neben seiner Aufgabe als apikaler Sortierrezeptor ist Galectin-3 je nach zellulärer Lokalisation an zahlreichen Prozessen beteiligt. Hierunter fallen u.a. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, Zellwachstum und Differenzierung, Signaltransduktion, Protein-Protein-Interaktionen, RNA-*Splicing*, Apoptose, Angiogenese und Tumorgenese (Dumic *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2006; Hughes, 2001; Nakahara und Raz, 2007; Takenaka *et al.*, 2004).

2.4.3 Sekretion und Endozytose von Galectin-3

Galectin-3 ist sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert und kann zwischen Nukleus und Zytoplasma pendeln. Da Galectin-3 keine ER-Signalsequenz besitzt scheint die Präsenz des Lectins außerhalb der Zelle auf einer unkonventionellen Sekretion zu beruhen (Lindstedt *et al.*, 1993). Es existieren vier verschiedene Mechanismen der unkonventionellen Sekretion (Abb. 2.6) (Nickel, 2005). Bei zwei dieser Wege sind intrazelluläre Vesikel wie Lysosomen und Exosomen aus dem endosomalen System involviert (Abb. 2.6 Weg 1 und 3). In einem alternativen Weg werden die Proteine direkt über die Membran

oder unter Verwendung von Transportproteinen aus der Familie der ABC-Transporter transloziert (Abb. 2.6 Weg 2). Der vierte Weg beschreibt einen Mechanismus, der als *membrane blebbing* bezeichnet wird (Mehul und Hughes, 1997). Dabei schnüren sich Mikrovesikel von der Plasmamembran ab und werden in den Extrazellulärraum freigegeben. Ein weiterer Sekretionsmechanismus (hier nicht dargestellt) beruht auf der Ausbildung von Autophagosomen und deren anschließender Fusion mit der Plasmamembran (Duran *et al.*, 2010; Manjithaya *et al.*, 2010).

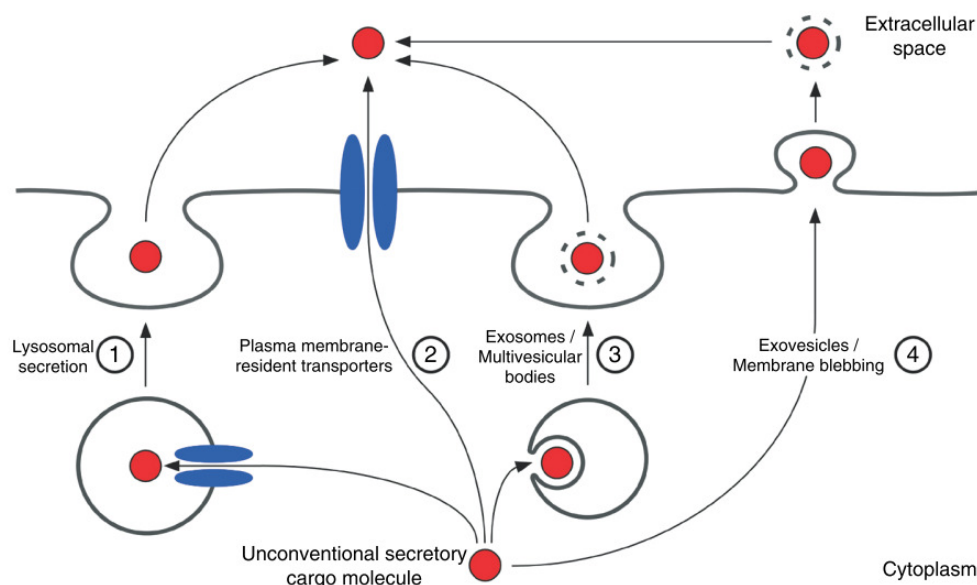


Abb. 2.6 Wege der unkonventionellen Sekretion

Unkonventionelle Sekretionsmöglichkeiten beinhalten vesikuläre Wege über Lysosomen (1) oder Exosomen (3) aber auch die Möglichkeit des Exports über membranständige Transporter (2) oder über *membrane blebbing* (4). (Nickel, 2005)

Nach Inhibition des klassischen Sekretionsweges, durch Verwendung von Monensin und Brefeldin A, die den Zerfall des Golgi und eine Akkumulation von Proteinen im ER bewirken, konnte kein Effekt auf die Sekretion von Galectin-3 festgestellt werden, was die Theorie einer unkonventionellen Sekretion von Galectin-3 untermauert (Lindstedt *et al.*, 1993). In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass Galectin-3 apikal sekretiert wird und dass eine Blockade des ABC-Transporters mit Verapamil ebenfalls keinen Einfluss auf die Lectin-

Sekretion besitzt. Desweiteren konnte Galectin-3 in Exosomen identifiziert werden (Schneider, 2011; Thery *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu konnte auch gezeigt werden, dass das Lectin eine Interaktion mit Lipiden der Membran eingehen kann und diese passiert (Lukyanov *et al.*, 2005). Letztlich lassen die bisherigen Untersuchungen keine Aussagen über den genauen Mechanismus der unkonventionellen Sekretion von Galectin-3 zu.

Im Extrazellulärraum befindliches Galectin-3 interagiert mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM). So induziert die Interaktion von Galectin-3 mit dem ECM-Protein Hensin die Multimerisierung und führt zur Differenzierung von Epithelzellen im renalen Sammelrohr (Hikita *et al.*, 2000). Durch seine strukturellen Eigenschaften bindet Galectin-3 auch verschiedene Glykoproteine auf der Zelloberfläche und führt zu einer Quervernetzung. Anhand des EGF-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass diese Quervernetzungen die Mobilität der Membranproteine reduzieren und deren Endozytose verhindern (Partridge *et al.*, 2004). In Brustkarzinom-Zellen wirkt Galectin-3 bei der Endozytose von Beta-1-Integrin in einem zuckerabhängigen Weg mit und wird dabei auch selbst über Caveolin-haltige Vesikel endozytiert (Furtak *et al.*, 2001). In Endothelzellen und Makrophagen erfolgt die Endozytose von Galectin-3 sowohl zuckerabhängig als auch -unabhängig (Gao *et al.*, 2012; Lepur *et al.*, 2012b). Wie in dieser Arbeit gezeigt, wird Galectin-3 nach seiner Exozytose wiederverwertet und, über einen bisher nur wenig verstandenen Mechanismus, erneut in die Zelle aufgenommen (siehe 4.2 *Endozytose und Recycling von Galectin-3 an der apikalen Membran von Epithelzellen*). Die Aufnahme in die Zelle kann über verschiedene Endozytosemechanismen erfolgen. An der Endozytose von Galectin-1 ist ein Clathrin-abhängiger und *lipid raft* abhängiger Mechanismus involviert (Fajka-Boja *et al.*, 2008). Der genaue Aufnahmemechanismus von Galectin-3 ist noch unbekannt. Erste Untersuchungen liefern bereits deutliche Hinweise darauf, dass es nach einer zuckerabhängigen Aufnahme in Recycling-Endosomen nahe der apikalen Membran akkumuliert (Schneider *et al.*, 2010).

2.5 Nierenzellkarzinome

2.5.1 Aufbau des renalen Tubulussystems

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, dessen Hauptaufgaben die Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushalts, die Ausscheidung von Endprodukten des Protein-, Purin-, und Stickstoff-Stoffwechsels und die Überwachung des Säure-Base-Haushalts ist. Außerdem fungiert es als endokrines Organ, das durch die Bildung von Hormonen an der Kontrolle des arteriellen Blutdrucks beteiligt ist. Das Nephron bildet die funktionelle Einheit der Niere und setzt sich zusammen aus dem Nierenkörperchen (Malthigi-Körperchen), bestehend aus dem von der Bowman-Kapsel umgebenen Glomerulus, und dem angrenzenden Tubulussystem. Im Nierenkörperchen wird das Ultrafiltrat gebildet und anschließend über das Tubulussystem bis zum Urether weitergeleitet. Das Tubulussystem lässt sich in verschiedene Abschnitte einteilen (Abb.2.7):

- **Proximaler Tubulus** mit einem gewundenen (*Pars convoluta*) und einem gestreckten Teil (*Pars recta*)
- **Intermediärtubulus** mit dem absteigenden Teil (*Pars descendens*) und dem aufsteigenden Teil (*Pars ascendens*)
- **Distaler Tubulus** mit einem gestreckten (*Pars recta*) und einem gewundenen Teil (*Pars convoluta*)
- **Verbindungstubulus**
- **Sammelrohr**

Die gestreckten Teile des proximalen und des distalen Tubulus werden mit dem Intermediärtubulus als Henle-Schleife bezeichnet.

Die Abschnitte des Tubulussystems lassen sich anhand ihrer Histologie voneinander unterscheiden.

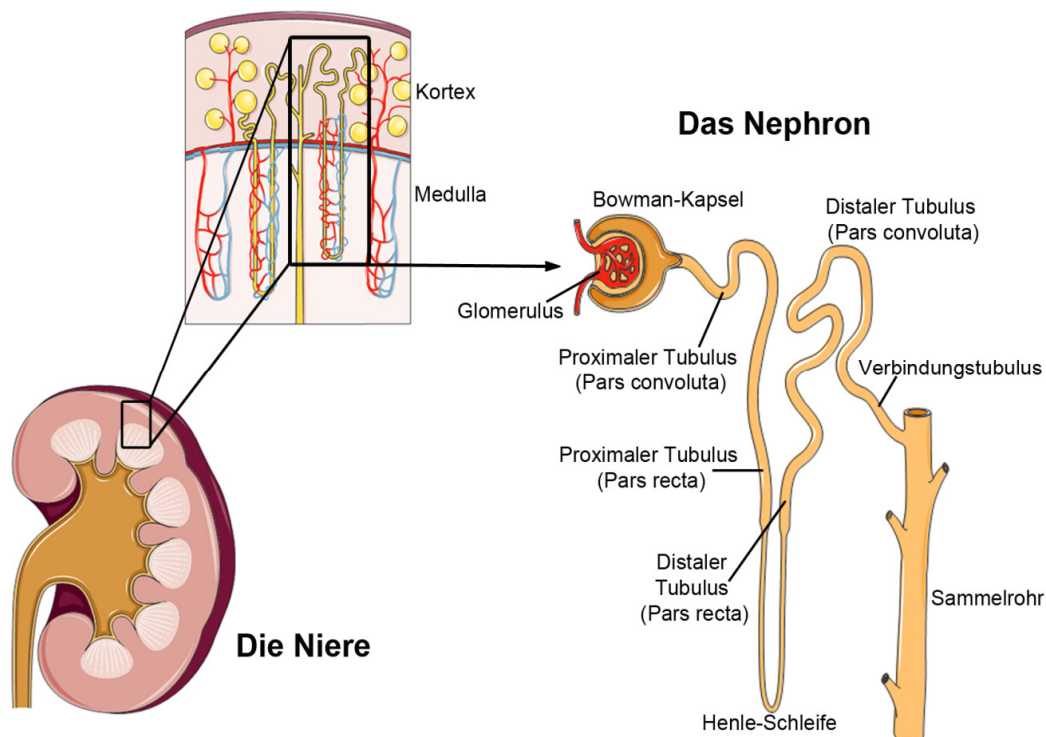


Abb. 2.7 Aufbau des renalen Tubulussystems

Die humane Niere besteht aus sechs bis neun Nierenlappen, die man in Nierenrinde (Kortex) und Nierenmark (Medulla) gliedert. In der Medulla befindet sich die funktionale Einheit der Niere, das Nephron. Es besteht aus dem Nierenkörperchen und dem angrenzenden Tubulussystem. Das Nierenkörperchen, indem das Ultrafiltrat gebildet wird, besteht aus dem Glomerulus und der umgebenden Bowman-Kapsel. Das Tubulussystem ist in verschiedene Tubulus-Abschnitte unterteilt. Zuerst passiert das Ultrafiltrat den gewundenen Teil (*Pars convoluta*) des proximalen Tubulus, gelangt dann durch die Henle-Schleife, bestehend aus dem gestreckten Teil (*Pars recta*) des proximalen Tubulus, dem Intermediärtubulus und dem gestreckten Teil des distalen Tubulus, zum gewundenen Teil des distalen Tubulus und von dort über das Verbindungsstück und das Sammelrohr in den Urether. In der Abbildung wurden Vorlagen von Servier Medical Art verwendet.

Der proximale Tubulus besitzt einen Durchmesser von 50 - 60 μm und ein enges Lumen; das Epithel ist einschichtig, kubisch bis niedrig-prismatisch, mit einem runden Zellkern und einem Bürstensaum aus langen, dicht gepackten Mikrovilli an der apikalen Zelloberfläche. Im apikalen Zytoplasma befinden sich zahlreiche Vesikel, Endosomen und Lysosomen. Sie bilden einen gut

ausgeprägten Endozytose-Apparat, der der Rückresorption und dem Abbau von Proteinen dient. Ein weiteres Charakteristikum dieser Zellen ist die hohe Anzahl an Mitochondrien im basolateralen Bereich; diese stellen das ATP für die Rückresorption bereit. Weiterhin finden sich im basolateralen Bereich zahlreiche Zellinterdigitationen, die der Vergrößerung der Diffusionsfläche der Zelle dienen.

Da die Hauptfunktion des intermediären Tubulus in der Ankonzentration des Harns durch Wasserresorption besteht, liegt in diesem Abschnitt ein einschichtiges Plattenepithel vor und die Zellen weisen eine geringere Anzahl an Zellorganellen auf.

Der distale Tubulus hat im Vergleich zum proximalen Tubulus einen kleineren Durchmesser von 30 - 45 μm , besitzt aber aufgrund seiner kleinen Epithelzellen ein größeres Lumen. Die kubischen Epithelzellen haben ein helles Zytoplasma mit rundem Kern und geringer Mitochondrienzahl. An der apikalen Zelloberfläche sind wenige bis keine Mikrovilli vorhanden. In diesem Tubulusabschnitt findet ein aktiver Ionentransport statt.

Nachdem der Harn den distalen Tubulus passiert hat, gelangt er über ein kurzes Verbindungsstück in das Sammelrohr. Der Durchmesser des Sammelrohres beträgt zu Beginn 50 μm und weitet sich in seinem distalen Abschnitt auf bis zu 300 μm aus. Das Lumen ist anfangs von einem kubischen Epithel ausgekleidet und geht dann über in ein prismatisches Epithel, bestehend aus zwei vorherrschenden Zelltypen. Dies sind zum einen die Hauptzellen mit hellem Zytoplasma und einem einzelnen Kinozilium an der apikalen Oberfläche und zum anderen die dunkleren, Mitochondrien-reichen Schaltzellen. Im Sammelrohr befinden sich auch Aquaporine in der Zellmembran, die für den hier stattfindenden Wassertransport verantwortlich sind (ausführlich dargestellt in (Ross, 2003, 2007; Welsch, 2003)).

2.5.2 Klassifikation der Nierenzellkarzinome

Das Nierenzellkarzinom, früher auch als Hypernephrom oder Grawitz-Tumor bezeichnet, ist mit 2 - 3 % aller malignen Tumore ein selten auftretender Tumor.

Allerdings ist er innerhalb der Gruppe von urologischen Tumoren mit einer Inzidenz von etwa 9 pro 100.000 Einwohner in Deutschland der dritthäufigste Tumor, wobei Männer 1,5-mal häufiger daran erkranken als Frauen (Fischer, 1999). In Deutschland sind pro Jahr mit etwa 8.000 bis 11.000 Neuerkrankungen zu rechnen (Storkel, 1999), für 2013 ist laut Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregister sogar mit etwa 14.000 Neuerkrankungen zu rechnen (www.gekid.de). Die Inzidenz steigt ab dem 35. Lebensjahr. Etwa 80 % aller Nierenzellkarzinome werden zwischen dem 40. und 62. Lebensjahr (Storkel, 1999) und häufig zufällig im Rahmen anderer Untersuchungen diagnostiziert. Bei Vorliegen eines nicht metastasierenden Nierenzellkarzinoms erzielt die operative Therapie des lokal begrenzten Tumors gute Ergebnisse, während die Prognose von Patienten mit Metastasierung schlecht ist. Risikofaktoren für die Ausbildung eines Nierenzellkarzinoms sind u.a. hohes Alter, Rauchen, chronische Niereninsuffizienz, Übergewicht aber auch Vererbung, wie z.B. bei dem von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL) (Foster *et al.*, 1994; Gnarra *et al.*, 1996; Handa und Kreiger, 2002; Talamini *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1986). Seit der grundlegenden Beschreibung eines Nierentumors 1883 durch Paul Grawitz erfolgten immer wieder Versuche zur einheitlichen Klassifizierung der Nierentumore aufgrund pathomorphologischer Unterschiede. Mitte der 80er Jahre führten die Arbeiten von Thoenes *et al.* zu einer neuen morphologischen Klassifizierung der Nierentumore, die die Grundlage der heutigen Klassifikation bilden (Thoenes *et al.*, 1990; Thoenes *et al.*, 1986). Anhand dieser Klassifikation können folgende Subtypen pathomorphologisch mit absteigender Inzidenz voneinander unterschieden werden:

- das klarzellige Nierenzellkarzinom (Inzidenz 75 %)
- das papilläre (chromophile) Nierenzellkarzinom (Inzidenz 15 %)
- das onkozytäre Nierenzelladenom (Inzidenz 7 %)
- das chromophobe Nierenzellkarzinom (Inzidenz 5 %)
- das metanephrogene Nierenzelladenom (Inzidenz < 1 %)
- das Sammelgangkarzinom (Ductus-Bellini) (Inzidenz < 1 %)

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC) ist gekennzeichnet durch eine massive zytoplasmatische Akkumulation von Glykogen und Lipiden, die bei der histologischen Präparation herausgelöst werden und das Zytoplasma klar erscheinen lassen (Mackay *et al.*, 1987). Diese Anreicherung kommt infolge eines gestörten, tumorbedingten Glykogen- und Lipidmetabolismus zustande. Der Tumor weist ein solides kompaktes Wachstumsmuster auf, kann aber auch in zystischer oder papillärer Form auftreten. Der Differenzierungsgrad ist meistens hoch und mit einer guten Prognose vergesellschaftet. Klarzellige Nierenzellkarzinome kommen oft im Rahmen des von-Hippel-Lindau Syndroms vor (Decker, 1998).

Das papilläre Nierenzellkarzinom ist das am zweithäufigsten vorkommende Nierenzellkarzinom und zeichnet sich durch sein tubulo-papilläres Wachstumsmuster aus. Das Vorkommen von basophilen, eosinophilen und gelegentlich aufgehellten Zellen verleiht diesem Tumor seine chromophile Bezeichnung (Decker, 1998).

Das nicht bösartige Onkozytom ist durch sein eosinophiles, granuläres, mit zahlreichen Mitochondrien angereichertes Zytoplasma charakterisiert. Das Wachstumsmuster ist solide und trabekulär, stellenweise sogar nestartig. In manchen Fällen ähnelt es einem papillären Nierenzellkarzinom (Decker, 1998, 2002).

Das chromophobe Nierenzellkarzinom weist zwei charakteristische Zelltypen auf. Auf der einen Seite Mitochondrien-reiche Zellen, die dem Onkozytom ähneln und auf der anderen Seite Zellen mit hellem Zytoplasma und Anhäufungen von invaginierten Vesikeln. Im Vergleich zum klarzelligen und papillären Nierenzellkarzinom zeichnet sich dieser Tumor durch ein langsames Wachstumsverhalten aus. (Cheville *et al.*, 2003)

Das selten vorkommende metanephrogene Nierenzelladenom ist durch dicht gepackte unreife Tubuli gekennzeichnet.

Das Sammelrohrkarzinom ist ein hoch maligner Tumor, der seinen Ursprung in den Hauptzellen des Sammelrohres hat. Durch seine aggressive Lymphinvasion und Metastasierung führt es im Mittel innerhalb von sechs

Monaten nach Diagnose zum Tod. Die morphologische Diagnostik ist aufgrund zytologischer Polymorphie dieses Tumors schwierig (Decker, 1998).

Die einzelnen Karzinome entstehen wie in Abb. 2.8 gezeigt aus unterschiedlichen Bereichen des renalen Tubulussystems. Das klarzellige und das papilläre Nierenzellkarzinom haben ihren Ursprung im proximalen Tubulus, während sich das chromophobe Nierenzellkarzinom und das Onkozytom aus dem Verbindungsstück zwischen distalem Tubulus und Sammelrohr entwickeln (Thoenes *et al.*, 1990). Neben den Grundzelltypen können auch eosinophile Zelltypen bis hin zu spindel-/polymorphzelligen Formen entstehen, was die Differenzierung erschwert.

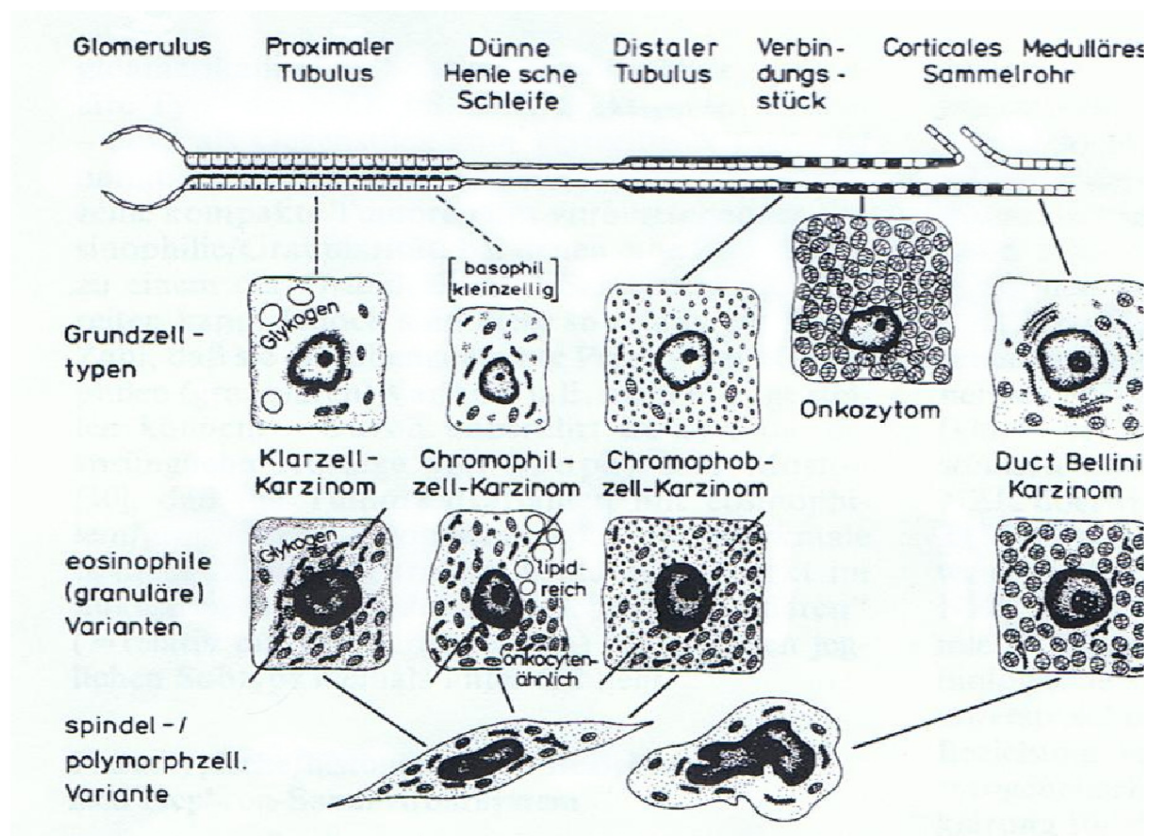


Abb. 2.8 Die verschiedenen Nierenzellkarzinome und ihr Ursprung im Tubulussystem

Dargestellt sind die Grundzelltypen und deren Entstehungsort im Tubulussystem. Außerdem gezeigt sind die aus den Grundzellen entstehenden eosinophilen/granulären und spindel-/polymorphzelligen Varianten. (Thoenes *et al.*, 1990)

Neben der Typisierung des Nierenzellkarzinoms erfolgt eine Bestimmung des Malignitätsgrad nach Syrjanen und Hjelt (Syrjanen und Hjelt, 1978). Dabei wird anhand des *Grading* (G) der Differenzierungsgrad und der Grad der Kernatypien bestimmt. Nach der pTNM-Klassifikation der UICC von 2002 werden zusätzlich die Ausbreitung des Tumors bzw. das *Staging* (T), Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) erfasst.

Grading

- G1** gut differenzierter Tumor mit kleinen, runden uniformen Zellkernen
- G2** mäßig differenzierter Tumor mit größeren, irregulären Kernen
- G3** schlecht differenzierter Tumor mit noch größeren Kernen
- G4** undifferenzierter Tumor mit bizarren, oft mehrfach gelappten Zellkernen und Chromatinklumpen

Staging

- T1** Tumor begrenzt auf die Niere, < 7cm
 - T1a** Tumor < 4 cm
 - T1b** Tumor zwischen 4 - 7 cm
- T2** Tumor begrenzt auf Niere aber > 7 cm
- T3** Infiltration des umliegenden Gewebes
 - T3a** Nebennieren- oder perirenale Infiltration
 - T3b** Nierenveneneinbruch oder Infiltration der Vena cava unterhalb des Zwerchfell
 - T3c** Infiltration der Vena cava oberhalb des Zwerchfells
- T4** Infiltration über die Gerota-Faszie hinaus

Lymphknotenmetastasen

- N0** keine Lymphknotenmetastasen
- N1** Metastasen in regionärem Lymphknoten vorhanden

Fernmetastasen

- M0** keine Fernmetastasen
- M1** Fernmetastasen

2.5.3 Galectin-3 und das klarzellige Nierenzellkarzinom

Galectine kommen in vielen verschiedenen Geweben vor und ihre Expression ist abhängig von der Entwicklung und Differenzierung des Gewebes sowie von physiologischen und pathologischen Bedingungen (Liu und Rabinovich, 2005). Im Urogenitaltrakt (insbesondere in der Blase und Niere) stellt Galectin-3 das am häufigsten vorkommende Galectin dar. Es ist vor allem im Epithel der distalen Tubuli und der Sammelrohre lokalisiert (Merseburger *et al.*, 2008a). Untersuchungen der humanen Niere zeigen, dass die Expression von Galectin-3 in der adulten Niere geringer ist, als in der fetalen Niere (Nio *et al.*, 2006). Neben seinen vielfältigen Funktionen wie z. B. die Beteiligung an der Apoptose, der Zell-Adhäsion, dem Zellwachstum und der Differenzierung von Zellen sowie dem Proteintransport, spielt es auch eine Rolle in der Tumorentwicklung (Liu und Rabinovich, 2005). Abhängig von seiner zellulären Lokalisation kann Galectin-3 durch Interaktion mit Oberflächenproteinen oder intrazellulären Proteinen pro- oder anti-apoptotisch wirken (Liu und Rabinovich, 2005). Auch in Metastasierung und Angiogenese spielt Galectin-3 eine entscheidende Rolle. Glinsky und Kollegen konnten darlegen, dass auf Endothelzellen befindliches Galectin-3 mit dem Thomsen-Friedenreich-Antigen auf Tumorzellen interagiert und dadurch in erhöhtem Maße Tumorzellen an die Gefäßwand andocken (Glinsky *et al.*, 2001). Die Zell-Zell-Adhäsion von Tumorzellen, einschließlich deren Adhäsion zur ECM, wird ebenfalls durch Galectin-3 gesteuert, hier jedoch durch Interaktion mit Integrinen (Takenaka *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen zu Interaktionspartnern in der Brustkrebszelllinie BT549 konnten ein Zusammenspiel von Galectin-3 mit Komponenten des Wnt-Signalweges (β -Catenin und Axin) zeigen (Shimura *et al.*, 2005).

Die Expression von Galectin-3 variiert in Tumorgeweben abhängig von ihrem Differenzierungsgrad. Eine Überexpression konnte bereits in Krebszellen bei Magen-, Leber-, Pankreas-, Schilddrüsen-, Eierstock- und Blasenkrebs demonstriert werden (Califice *et al.*, 2004b; Takenaka *et al.*, 2004). Dagegen zeigt sich in Krebszellen des Endometriums (van den Brule *et al.*, 1996), der Brustdrüse (Castronovo *et al.*, 1996) und der Prostata (Califice *et al.*, 2004a) eine Reduktion der Galectin-3 Expression. In Nierenzellkarzinomen sinkt die

Expression des Lectins mit der Zunahme der Aggressivität des Tumors (Danguy *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 2004) und in Colonkarzinomen konnte wiederum kein einheitliches Expressionsverhalten von Galectin-3 festgestellt werden (Bresalier *et al.*, 1998; Lotz *et al.*, 1993).

Neben einer Überexpression des Lectins in klarzelligen Nierenzellkarzinomen (Dancer *et al.*, 2010; Francois *et al.*, 1999; Sakaki *et al.*, 2010) existieren auch Studien, die den Verlust der Expression während der Tumorgenese zeigen (Merseburger *et al.*, 2008a).

2.6 Weitere Proteine der Arbeit

2.6.1 CEACAM1

CEACAM1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*), auch bekannt als BGP (*biliary glycoprotein*) (Svenberg, 1976) oder CD66a (Skubitz *et al.*, 1992), ist ein Transmembranprotein und gehört zur Immunglobulin-Superfamilie der Zell-Zell Adhäsionsmoleküle (Kammerer *et al.*, 2007). Es besteht aus einer N-terminalen Domäne, die homolog zur variablen Immunglobulin (IgV) Domäne ist, und aus bis zu sechs Wiederholungen einer konstanten Immunglobulin (IgC) -ähnlichen Domäne. Es existieren verschiedene Isoformen von CEACAM1, die sich in ihrer zytoplasmatischen Domäne und in der Anzahl der Ig-ähnlichen Domänen voneinander unterscheiden. Durch alternatives Spleißen entsteht entweder eine lange (72 - 74 Aminosäuren, CEACAM1-L) oder eine kurze (12 - 14 Aminosäuren, CEACAM1-S) zytoplasmatische Domäne (Kammerer *et al.*, 2007). Die lange zytoplasmatische Domäne beinhaltet zwei ITIMs (*immune receptor tyrosine-based inhibition motifs*), die inhibitorische Signale vermitteln (Chen *et al.*, 2001), während die kurze zytoplasmatische Domäne eine Rolle in der Differenzierung von Epithelzellen spielt (Kirshner *et al.*, 2003). Die Länge der zytoplasmatischen Domäne ist zudem ausschlaggebend für die zelluläre Lokalisation des Proteins. CEACAM1-L konnte an der apikalen und lateralen Zelloberfläche polarisierter Epithelzellen detektiert werden, während CEACAM1-S nur apikal lokalisiert ist

(Sundberg *et al.*, 2004). Entscheidend für den polarisierten Transport des Proteins sind seine zahlreichen N-Glykosylierungen, die es als Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa definieren (Hammarstrom, 1999).

In vorangegangenen Untersuchungen zu gp114, dem Hauptsialoglykoprotein in MDCK Zellen, zeigte sich, dass gp114 in Bezug auf Antikörperdetektion, zelluläre Lokalisation und Glykosylierungsmuster dem caninen Protein CEACAM1 entspricht (Schneider, 2011). In weiteren Studien aus unserem Labor konnte gezeigt werden, dass gp114 mit dem galactosebindenden apikalen Sortierrezeptor Galectin-3 interagiert und dass eine Deletion des Lectins zur Fehlsortierung von gp114 zur basolateralen Membran führt (Delacour *et al.*, 2006; Delacour *et al.*, 2007).

CEACAM1 wird in vielen verschiedenen Zellen wie z.B. T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Endothelzellen, Epithelzellen der Niere und Blase exprimiert (Hammarstrom, 1999; Prall *et al.*, 1996). In den Epithelzellen der Blase und des proximalen Tubulus der Niere ist es vorwiegend auf der luminalen, d.h. apikalen Membran exprimiert. Aufgrund seiner Herunterregulation während der Entstehung verschiedener Tumore wie dem Prostata-, Rectum-, Brust-, Blasen- und Nierenkrebs wird CEACAM1 eine Rolle als Tumorsuppressorgen zugeschrieben (Kammerer *et al.*, 2004; Neumaier *et al.*, 1993; Riethdorf *et al.*, 1997; Tilki *et al.*, 2010). Bei der Untersuchung von Blasenkrebs konnte neben der Herunterregulation von CEACAM1 in den Krebszellen eine Hochregulation des Proteins in angrenzenden Endothelzellen festgestellt werden, wodurch CEACAM1 neben seiner Funktion als intra- und interzelluläres Adhäsionsmolekül eine proangiogene Aktivität zuzuschreiben ist (Ergun *et al.*, 2000).

2.6.2 p75-Neurotrophinrezeptor (p75^{NTR})

p75^{NTR} ist ein 75 kDa großer, in Vertebraten hoch konservierter, Typ I-Transmembranrezeptor. Er zählt zu den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-R). Stabil mit p75^{NTR} transfizierte MDCK Zellen transportieren den Oberflächenrezeptor primär zur apikalen Zellmembran (Le Bivic *et al.*, 1991).

Die cysteinreiche Extrazellulärdomäne besteht aus drei bis sechs durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten. Eine dieser cysteinreichen Untereinheiten besitzt eine N-Glykosylierung, die allerdings bei der apikalen Sortierung des Proteins keine Rolle zu spielen scheint (Johnson *et al.*, 1986). Neben den N-Glykanen befinden sich in der Stab-Domäne in der Nähe der Transmembran-Domäne sechs O-Glykane, die für den apikalen Transport verantwortlich sind (Breuza *et al.*, 2002). Wird diese O-glykosylierte Stab-Domäne deletiert, kommt es zum vermehrten basolateralen Transport von p75^{NTR} (Yeaman *et al.*, 1997). Galectin-3 fungiert in MDCK Zellen bei der apikalen Sortierung von p75^{NTR} als Sortierrezeptor. Dabei bindet es an die O-Glykane und induziert die Bildung hochmolekularer Komplexe, die *lipid raft* unabhängig transportiert werden (Delacour *et al.*, 2006; Delacour *et al.*, 2007). Das humane p75^{NTR} wird normalerweise in neuronalen Zellen synthetisiert und wiederverwertet (Deinhardt *et al.*, 2007).

2.6.3 gp80

Das Glykoprotein gp80, auch bekannt unter dem Namen Clusterin, ist das in MDCK Zellen am stärksten apikale sekretierte Protein (Martin-Belmonte *et al.*, 2001). Es besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa und besteht aus zwei durch Cystein-Brücken verbundene Untereinheiten von ca. 35 und 45 kDa. Es ist an sieben Stellen N-glykosyliert. Für die apikale Sortierung des Proteins sind die N-Glykosylierung sowie intakte Mikrotubuli erforderlich (Parczyk *et al.*, 1989; Urban *et al.*, 1987). Durch die Überexpression der Tubulin-Tyrosin-Ligase verlangsamt sich der Transport von gp80 zur apikalen Membran (Zink *et al.*, 2012). Außerdem wurden zwei Rezeptoren mit dem Transport von gp80 in Verbindung gebracht. Dabei handelt es sich um das lipid-raft assoziierte, nicht glykosylierte Membranprotein MAL (Martin-Belmonte *et al.*, 2001) und das intrazelluläre Lectin VIP36, das bei Überexpression die Sekretion von gp80 steigert (Hara-Kuge *et al.*, 2002). Clusterin wird ubiquitär exprimiert und ist innerhalb der Säugetiere hoch konserviert. Entsprechend wird vermutet, dass canines und humanes gp80 ähnliche Funktionen besitzen. Es fungiert als

extrazelluläres Chaperon und wird über den durch Stress induzierten Transkriptionsfaktor *heat shock factor 1* reguliert (Poon *et al.*, 2002).

2.6.4 CD29

CD29 bezeichnet die β_1 -Untereinheit von Integrin. Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren, die die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbinden. In Säugern sind 18 α -Untereinheiten bekannt, die sich mit acht β -Untereinheiten zu 24 verschiedenen Integrinen zusammenlagern können. In polaren Zellen kommen sie an der basolateralen Membran vor. Der Transport von neu synthetisiertem Integrin vom ER zur Membran erfolgt über einen Myosin-abhängigen vesikulären Transport entlang der Aktinfilamente, und wird vermutlich durch Talin reguliert (Margadant *et al.*, 2011). Für die basolaterale Sortierung des Integrins sind die zytoplasmatischen Domänen beider Untereinheiten verantwortlich (Gut *et al.*, 1998).

Fragestellung dieser Arbeit

Die Fragestellung dieser Arbeit kann in verschiedene Teilaspekte untergliedert werden. Bei den bisherigen Erkenntnissen über die Endozytose, die Ligandenbindung und Komplexbildung von Galectin-3 und seinem Einfluss bei der Entstehung von Nierenzellkarzinomen blieben immer wieder Fragen offen, die den Anstoß für diese Arbeit lieferten.

Nach bisherigen Erkenntnissen wird Galectin-3 über einen unkonventionellen Sekretionsweg unter Beteiligung von exosomalen Vesikeln in den Extrazellulärraum entlassen. Vermutlich kann das Lectin von dort wieder in die Zelle aufgenommen werden. Endozytiertes Galectin-3 befindet sich nach Aufnahme in endosomalen Kompartimenten an der subapikalen Oberfläche, doch der genaue Mechanismus der Internalisation ist noch ungeklärt. Die Aufnahme kann über verschiedene Endozytosemechanismen erfolgen und ist von der Bindung des Lectins an zuckerhaltige Liganden auf der Oberfläche abhängig. In diesem Teil der Arbeit soll der Weg der Endozytose mittels hochauflösender Mikroskopie und biochemischer Analysen genauer untersucht werden. Dabei sollen die Bindung des Lectins an zuckerhaltige Liganden auf der Zelloberfläche, die Assoziation mit *lipid rafts* und der Einfluss des pH Wertes berücksichtigt werden. Desweiteren soll die Frage geklärt werden, ob endozytiertes Galectin-3 erneut sekretiert wird und somit ein Kreislauf entsteht.

Galectin-3 fungiert als Sortierplattform zur apikalen Membran für *lipid raft* unabhängige Cargoproteinen. Dabei existiert bereits ein gutes Modell der Multimerisation des Lectins und der Komplexbildung mit Liganden. Auf dem Weg zur apikalen Membran passiert Galectin-3 mit seinen Liganden endosomale Kompartimente mit leicht saurem pH. In einem Teilprojekt soll die Ligandenbindung und Komplexbildung von Galectin-3 in Abhängigkeit vom pH Wert untersucht werden. Zusätzlich soll der Einfluss des pH Wertes auf die Sortierung des apikalen Neurotrophinrezeptors p75 und auf die apikale Sekretion von gp80 mit Hilfe biochemischer Untersuchungen geklärt werden.

Es ist bekannt, dass Galectin-3 neben dem Proteintransport an vielen weiteren Prozessen wie der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, der Endozytose, der

Zellentwicklung und -differenzierung und der Regulation der Apoptose beteiligt ist. Im Hinblick auf diese Funktionen soll im zweiten Teil der Arbeit die Rolle von Galectin-3 bei der Entstehung von klarzelligen Nierenzellkarzinomen näher beleuchtet werden. Dabei soll mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und Western-Blotanalysen die Lokalisation und Expression von Galectin-3 mit Hilfe apikaler und basolateraler Markerproteine in gesundem Nierengewebe und Tumorgewebe von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen und im Zellkulturmodell untersucht werden. Desweiteren sollen mögliche Interaktionspartner von Galectin-3 während der Tumorentstehung mittels Coimmunpräzipitation und Galectin-3-Affinitätssäule mit anschließender ESI-MS/MS Untersuchung identifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Inkubatoren	
RS Biotech Galaxy B (CO ₂ begast)	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Inkubator für Bakterienkultur	Memmert, Schwabach
Schüttelinkubator für Bakterienkultur innova 4300	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Sterilbänke	
Sterilbank für Zellkultur HeraSafe	Kendro, Langenselbold
Sterilbank für Bakterienkultur Faster BHA-48	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zentrifugen	
Tischzentrifuge BioFuge pico	Heraeus
Tischzentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)
Kühlzentrifuge BioFuge fresco	Heraeus
Kühlzentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann-Coulter, Fullerton (USA)
Kühlzentrifuge Allegra X-22R	Beckmann-Coulter, Fullerton (USA)
Rotofix 32X	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifugen	
Optima LE-80K	Beckmann-Coulter, Fullerton (USA)
Combi Plus	Sorvall
Rotoren	
SW-41	Beckmann-Coulter, Fullerton (USA)
TH641	Sorvall
FX 301.5	Beckmann-Coulter, Fullerton (USA)
SX4250	Beckmann-Coulter, Fullerton (USA)
C1015	Beckmann-Coulter, Fullerton (USA)
JA 25.50	Beckmann-Coulter, Fullerton (USA)
JLA 16.250	Beckmann-Coulter, Fullerton (USA)
1619 für Rotofix	Hettich, Tuttlingen
Schüttler	
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph, Kehlheim
DOS-10L	NeoLab
PMR-30	Grant-bio, Camebridgeshire (UK)

Heizgeräte

Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UBD	Grant Instruments, Cambridgehire (UK)
MB-102	Bioer Technology, Hangzhou (China)
Kontrollgerät Tempcontrol 37-2 digital (für Mikroskop DMI6000B)	Leica Microsystems, Wetzlar

SDS-PAGE und Western-Blot

Platten, "Spacer", Kämme	Hoefer, San Francisco (USA)
Gießvorrichtung	Hoefer, San Francisco (USA)
Elektrophoresekammer miniVE	Hoefer, San Francisco (USA)
Elektrophoresekammer Mignty Small II	Hoefer, San Francisco (USA)
Netzgerät EPS 301	Hoefer, San Francisco (USA)
Netzgerät EPS 501	Amersham Biosciences, Piscataway (USA)
Netzgerät Power Pack Basic	Amersham Biosciences, Piscataway (USA)
Transblot Semi-Dry Transfer Cell	Biorad, Hercules (USA)

Mikroskope

Konfokales Laser-Scanning- Mikroskop (KLSM) TCS SP2 montiert auf Stativ DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Epifluoreszenzmikroskop DMI6000B, zusätzlich ausgestattet mit Leica AM TIRF MC Modul	Leica Microsystems, Wetzlar
SR GSD (GSDIM)	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Elektronenmikroskop EM109	Carl Zeiss AG, Oberkochen

Sonstige optische Geräte

Chemilux-Imager	Intas, Göttingen
Gelscanner GS800 Calibrated Densitometer	Biorad, Hercules (USA)
Tecan infinite M200	Tecan, Männerdorf (Schweiz)
FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lake (USA)
Spektralphotometer Specord S300 UV VIS	Analytic Jena, Jena

Sonstige Geräte

Analysewaage SBC 22	ScalTec Instrument, Göttingen
Präzisionswaage SI-114	Denver Instruments, Bohemia (USA)
Absaugpumpe 2511	Welch, Niles (USA)
Dry Vacuum Pump/Compressor Absaugpumpe N86 KN.18	KNF Neuberger, Freiburg

Heizrührer Yellow Line MSH basic	Ika Labortechnik, Staufen
pH-Meter pH510	Eutech Instruments, Waltham (USA)
Nanodrop 2000c	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (USA)
Mikrotom HM 400	Microm, Heidelberg
Paraffinblockgießapparatur	Microm, Heidelberg
Reinstwassersystem Elix UV	Millipore, Billerica (USA)
Schweißgerät Vacupack Plus	Krupps, Solingen
Wasserbad GFL 10023	GFL GmbH, Burgwedel
Peristaltische Pumpe Minipuls 3	Abimed/Gilson (Frankreich)
ESI MS/MS	Thermo Fischer Scientific
Äkta	GE

Software

Office 2007	Microsoft, Redmond (USA)
Photoshop CS5	Adobe, SanJose (USA)
Leica LASAF	Leica, Wetzlar
Lab Image	Intas, Göttingen
Prism 5	Graph Pad, La Jolla (USA)

3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie/Material	Bezugsquelle
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
APS	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	DIFCO, Detroit (USA)
Bacto Trypton/ Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson; Sparks (USA)
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Darmstadt
Cryoröhrchen	Greiner, Kremsmünster
Cycloheximid	Fluka
Deckgläser (18 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
DMSO	Roth, Karlsruhe
Depression Slide (76x26 mm)	neoLab, Heidelberg

DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
ECL-Reagenz Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
EPPS	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Serva, Heidelberg
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, Rockwell (USA)
FKS	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
L-Glutamin (10x)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
HEPES	Serva, Heidelberg
IPTG	Biomol
Lactosylsepharose Beads	EY Laboratories, San Mateo (USA)
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Magermilchpulver	Serva, Heidelberg
β-Mercaptoethylamine (MEA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Molekulargewichtsstandard für SDS-PA-Gele PageRuler	Fermentas, St. Leon-Rot
Mowiol 4-88	Merck, Darmstadt
NeutrAvidin (immobilized)	Pierce, Rockwell (USA)
Nitrocellulose-Membran Protran	Schleicher & Schüll, Dassel
NP-40	Merck, Darmstadt
Nycodenz	Axis Shield, Oslo (Norwegen)
Penicillin/Streptomycin (10x)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Greiner, Kremsmünster (Österreich)
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nürnberg
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Spitzen, Kanülen	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter, 0,45 µm	Millipore, Billerica (USA)
TEMED	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Twinsil	Picodent, Wipperfürth
Zellkulturplatten	Wilco, Amsterdam (Niederlande) und Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturplatten (6 Loch, 24 Loch)	Greiner, Kremsmünster
Zellkultur Filtereinsätze	Greiner, Kremsmünster
Ziegenserum	Dako, Dänemark
Whatmann 3MM	Whatmann, Maidstone (UK)

Weitere hier nicht aufgeführte, aber allgemein gebräuchliche Chemikalien sind mindestens von p.a.-Qualität und wurden von Sigma, Roth, Riedel-de Häen, Fluka, Merck, Serva oder ICN bezogen.

3.3 Allgemeine Puffer

Alle hier aufgeführten Lösungen wurden mit sterilem, doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

PBS

140 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
6,5 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	K ₂ HPO ₄
pH 7,35	

PBS++

PBS zusätzlich mit

1 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂

3.4 Zellkultur

3.4.1 Verwendete Zelllinien

MDCK Typ II (Madin-Darby Canine Kidney)

MDCK-II- Zellen sind Epithelzellen aus dem distalen Nierentubulus eines weiblichen Cockerspaniels (Madin *et al.*, 1957). In Kultur wachsen sie adhärent und bilden nach Erreichen von Konfluenz ein einschichtiges, zylindrisches

Epithel, welches sich durch eine ausgeprägte *Zonula occludens* (*tight junctions*) auszeichnet. Durch die Ausbildung der *tight junctions* wird die apikale Plasmamembran (dem Lumen zugewandt) vom basolateralen Teil der Membran (der Basalmembran zugewandt) getrennt. Sie können auf permeablen Filtern kultiviert werden, wodurch ein selektiver Zugang zur apikalen bzw. basolateralen Membran ermöglicht wird. Die Polarisierung der Zellen beginnt etwa zwei Tage nach Ausplattieren und endet nach etwa weiteren vier Tagen. Aufgrund ihrer Eigenschaften eignen sie sich ideal als Modell für den polarisierten Proteintransport.

RC-124 (Humane Nierenzelllinie)

Bei diesen Zellen handelt es sich um humane Epithelzellen aus einer Niere eines 63 Jahre alten, kaukasischen Mannes. Sie wurden 1998 isoliert und für diese Arbeit von CCS (Cell Culture Service, Hamburg) bezogen. Die Zellen wachsen adhärent und bilden nach Erreichen von Konfluenz ein einschichtiges Epithel aus. Die Zellen besitzen eine längliche Struktur mit einer vorherrschenden Zellkörperregion im Vergleich zur peripheren Lamellopodienformenden Region. Die durchschnittliche Zellhöhe beträgt 5 µm.

RCC-FG1 (KTCTL-26; Humane Niere, Klarzell-Karzinom Zelllinie)

Bei diesen Zellen handelt es sich um Epithelzellen (bezogen von CCS), die 1999 aus einem klarzelligen Nierenzellkarzinom eines 69 Jahre alten, kaukasischen Mannes isoliert wurden. Die Tumorgroße betrug ≥ 7 cm und die Ausbreitung begrenzte sich auf die Niere (GII, T2a). In Kultur wachsen die Zellen adhärent und aufgrund von Kontaktinhibition nicht übereinander. Ihre Verdopplungszeit beträgt 35 h und sie bilden eine längliche, irreguläre Struktur. Die RCC-FG1 Zellen sind besser differenziert als vergleichbare klarzellige Nierenzellkarzinom Zelllinien und eignen sich daher sehr gut als Modell für das klarzellige Nierenzellkarzinom (Frank und Pomer, 1999; Lutz *et al.*, 2005).

3.4.2 Auflistung Zelllinien

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Zelllinien verwendet. Sämtliche für die Zellkultur verwendete Medien und Lösungen wurden von PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen; mit Ausnahme von Zeocin, das von Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen wurde.

Zelllinie	Eigenschaften	Medium
MDCK II Wildtyp	Polare Epithelzellen aus der Hundeniere	MEM 5 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ mL Penicillin 100mg/ mL Streptomycin
MDCK _{Gal3-YFP}	Stabil mit Galectin-3 transfizierte MDCK-II-Zelllinie; Galectin-3 ist für die Selektion mit YFP fusioniert	DMEM high Glucose 10 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ mL Penicillin 100mg/ mL Streptomycin
MDCK _{Gal3-R186S-GFP}	Stabil mit Galectin-3-R186S transfizierte MDCK-II-Zelllinie; fusioniert mit GFP; der Aminosäureaustausch von Arginin (R) gegen Serin (S) verhindert die Erkennung von LAcNac-Glykosylierungen	DMEM high Glucose 10 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ mL Penicillin 100mg/ mL Streptomycin
MDCK _{p75-GFP}	MDCK-II-Zelllinie mit stabil transfiziertem humanem p75 ^{NTR} fusioniert mit GFP	DMEM high Glucose 10 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ mL Penicillin 100mg/ mL Streptomycin 0,5 mg/ mL G418
MDCK _{CEACAM1-GFP}	Canines CEACAM1-4L (gp114) fusioniert mit GFP stabil transfiziert in MDCK-II-Zellen	DMEM high Glucose 10 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ mL Penicillin 100mg/ mL Streptomycin 0,5 mg/ mL G418
MDCK _{Flotillin1-YFP}	MDCK-II-Zelllinie mit stabil transfiziertem Flotillin-1 fusioniert mit YFP	MEM 5 % FKS 2 mM Glutamin 100 U/ mL Penicillin 100mg/ mL Streptomycin 0,5 mg/ mL G418
RCC-FG1	Humane Epithelzellen aus einem klarzelligen Nierenzellkarzinom	Mc Coy's 5A 10 % FKS 2 mM Glutamin
RC-124	Epithelzellen aus der humanen Niere	Mc Coy's 5A 10 % FKS

3.4.3 Kultivierung

Die Zellen wurden auf Plastikpetrischalen oder in 6- oder 24- Loch-Schalen bei 37°C, 5 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um bei Bedarf eine selektive Erreichbarkeit der apikalen und basolateralen Membran zu ermöglichen wurden die Zellen auf PET-Filtern im 6- oder 24- Loch-Format ausgesät (Abb. 3.1). Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die verwendeten Medien sind in 3.4.2 (*Auflistung Zelllinien*) aufgeführt.

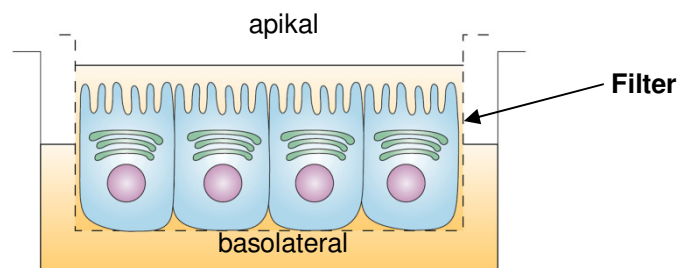


Abb. 3.1 Kultivierung von MDCK-II Zellen auf PET-Filtern

Auf PET-Filtern ausgesäte MDCK-II Zellen bilden eine geschlossene Zellschicht mit hoher elektrischer Dichtigkeit und Polarisierung. Die Kultivierung auf Filtern ermöglicht den separaten Zugang zur apikalen oder basolateralen Membran. (Rodriguez-Boulan *et al.*, 2005) modifiziert.

3.4.4 Passage

Alle Zelllinien wurden nach Erreichen von 80-100% Konfluenz, etwa am dritten Tag nach Ausplattieren auf neue Kulturschalen passagiert. Dazu wurden die Zellen nach zweifachem Waschen mit PBS für 15 - 20 min bei 37°C mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in D-PBS) von der Zellkulturplatte gelöst. Dabei sorgt Trypsin für die Spaltung von zur Adhäsion benötigten Oberflächenproteinen und EDTA chelatiert Calcium-Ionen, welche bei der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten und Zell-Matrix-Kontakten wichtig sind. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe des jeweiligen Kulturmediums in etwa fünffachem Volumen gestoppt und die Zellen wurden anschließend 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des überstehenden Mediums wurde das Zellpellet in 4 mL Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:4 bis 1:60, je nach weiterer Verwendung, auf neue Schalen ausgesät.

Zum Aussäen der Zellen auf Deckgläschen wurden diese vorher sterilisiert und vor dem Aussäen in die Zellkulturschale gelegt. Bei der Kultivierung auf PET-Filtern wurden die Zellen nur im Einsatz ausgesät.

3.4.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen können nach sorgfältigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff gelagert werden und bei Bedarf wieder aufgetaut werden. Zum Einfrieren wurden konfluente Zellen auf 10 cm Schalen von der Schale abgelöst (siehe 3.4.4 *Passage*). Das Zellpellet wurde in 1 mL Einfriermedium (80 % entsprechendes Medium; 10 % FKS; 10 % DMSO) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach Zwischenlagerung für 2 h bei -20 °C und 12 h bei -80 °C wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in 4 mL Medium aufgenommen und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und auf eine 10 cm Schale ausgesät.

3.4.6 RNA-Interferenz

RNA Interferenz (RNAi) ist ein in Zellen natürlich vorkommender Mechanismus, der der zielgerichteten Abschaltung von eigenen oder fremden Genen dient. Mittels RNAi lässt sich die Expression eines Proteins um 90 - 100% reduzieren. Es existieren unterschiedliche Möglichkeiten der RNAi Interferenz. In der vorliegenden Arbeit wurden siRNAs (*short interfering RNAs*) verwendet (Elbashir *et al.*, 2001; Karagiannis und El-Osta, 2005). Dabei handelt es sich um kurze dsRNA-Stücke von 21 - 23 bp Länge mit 2 bp Überhang am 3'-Ende, die in die Zelle eingebracht werden und eine gezielte Degradation der homologen RNA bewirken. Die eingebrachte dsRNA wird in der Zelle von Proteinen der Argonaut-Familie erkannt und in den RISC (*RNA-induced silencing complex*) Komplex eingebaut. Der antisense RNA-Strang leitet den RISC Komplex zur komplementären Ziel-RNA. Diese wird daraufhin degradiert und es kommt zur Hemmung der Proteinexpression auf Translationsebene. Man spricht hier von einem *knock down*, im Gegensatz zu einem *knock-out*, bei dem eine Proteinexpression bereits auf DNA-Ebene ausgeschaltet wird.

Durch Anwendung der RNAi Interferenz können Rückschlüsse auf die Funktion ausgeschalteter Proteine gezogen werden. Die Transfektion der siRNA erfolgte mittels Lipofectamin 2000. Die verwendeten Zellen wurden am Vortag im Verhältnis 1:15 bzw. 1:60 auf Filter in 6- bzw. 24- Loch-Schalen gesplittet und kurz vor der Transfektion mit PBS gewaschen. Für einen Filter wurden folgende Transfektionsansätze verwendet:

Filter in 6 Loch-Schale:

Lipofectaminansatz: 1 mL DMEM (-/-) + 10 µL Lipofectamin 2000

RNA-Ansatz: 1 mL DMEM (-/-) + 1 µL siRNA (200pmol)

Filter in 24 Loch-Schale:

Lipofectaminansatz: 0,5 mL DMEM (-/-) + 5 µL Lipofectamin 2000

RNA-Ansatz: 0,5 mL DMEM (-/-) + 0,5 µL siRNA (200pmol)

Pro Ansatz wurden zwei siRNAs zu gleichen Teilen eingesetzt. Nach 5 minütiger Inkubation der Ansätze bei RT wurde der Lipofectaminansatz mit dem RNA-Ansatz gemischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 0,5 mL Transfektionsansatz auf die apikale Seite und 1,5 mL bzw. 0,5 mL auf die basolaterale Seite gegeben. Nach 6 stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium gegen Vollmedium ausgetauscht. Die Transfektion wurde am nächsten Tag wiederholt. Um einen effizienten *knock down* zu erzielen, ließ man die Zellen noch zwei weitere Tage ruhen bevor am fünften Tag nach aussäen die weiteren Experimente durchgeführt wurden.

Folgende siRNA-Duplices gegen Galectin-3 wurden verwendet:

Galectin-3 a:

5`-AUACCAAGCUGGAUAAUAUTT-3`
3`-TTUAUGGUUCGACCUAUUAUA-5`

Galectin-3 b:

5`-ACCCAAACCCUCAAGGAUGTT-3`
 3`-TTUGGGUUUGGGAGUCCUAC-5`

Als Kontrolle wurde eine siRNA verwendet, die gegen das in MDCK-Zellen nicht vorhandene Protein Luciferase gerichtet ist:

5`-CGUACGCGGAAUACUUCGA-3`
 3`-GCAUGCGCCUUAUGAAGCU-5`

3.5 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen nach zweifachem Waschen mit PBS++ in Lysispuffer versetzt mit 20 µL/mL Protease-Inhibitor-Mix (PI) aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Gummischabers von der Platte abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen 30 min auf dem Überkopfschüttler bei 4°C lysiert. Je nach Versuchsbedingung erfolgte zusätzlich der Aufschluss durch Scheren mit einer 22G Kanüle. Die Zelldebris wurden durch Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, unmittelbar weiterverwendet oder alternativ bei -20°C gelagert.

Standardlysispuffer (CoIP-Lysispuffer)

25 mM	Tris
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
100 mM	NaCl
1% (v/v)	Triton-X-100
0,5% (v/v)	NP-40
pH 7,5 (mit HCl)	

Protease-Inhibitor-Mix (PI)

Lösung 1: PMSF 3,4 mg/mL (in DMSO)

Lösung 2: 20 µL Pepstatin (1 mg/ mL in DMSO)
20 µL Antipain (1 mg/ 200µL in DMSO)
20 µL Leupeptin (1 mg/ 200µL in PBS)
20 µL Aprotinin (1 mg/ mL in PBS)
20 µL Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor (25 mg/ 500µL in PBS)

Vor Gebrauch wurden 25 µL Lösung 1 mit 500 µL Lösung 2 gemischt.

3.5.2 Herstellung von Gewebelysaten

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Gewebeproben aus der Niere von insgesamt 101 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom untersucht. Die Entnahme erfolgte während der Nephrektomie und wurde am Universitätsklinikum Marburg von Prof. Dr. Hegele durchgeführt. Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg bewilligt und die Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis. Nach Entnahme wurden die Gewebeproben in eiskaltem PBS mit 20 µL/mL Protease Inhibitor (PI) zwischengelagert und anschließend in CoIP-Lysispuffer mit PI überführt. Nach Aufschluss mit einem Dounce Homogenisator wurden die Proben bei 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert, anschließend bei 4500 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Analyse verwendet.

3.5.3 TCA/Aceton Fällung

Die Proteinfällung mittels Trichlor-Essigsäure eignet sich zum Ankonzentrieren von Proteinen. Die Proben wurden mit 30 % TCA (Endkonzentration 10 %) versetzt, kurz gevortext und 5 min bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer weiteren 30minütigen Inkubation bei RT wurden das Präzipitat durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet zweimal mit 500 µL Aceton gewaschen, 5 min geschüttelt und 5 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach dem

Waschen wurde das Pellet getrocknet, und in 40 μL 3x Probenpuffer aufgenommen.

3.5.4 Proteinbestimmung mit DC Protein Assay

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde das *DC Protein Assay* Reagent (BioRad) verwendet. Die Reaktion basiert auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry und eignet sich gut zur Bestimmung des Proteingehalts in Gewebeextrakten. Die Nachweisreaktion besteht aus einer Biuret-Reaktion mit einer anschließenden Farbkomplexbildung. In der ersten Reaktion reduzieren die vorhandenen Proteine Cu^{2+} zu Cu^{+} , welches dann in der zweiten Reaktion mit dem gelben Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän (VI)- und Wolfram (VI)- Heteropolysäuren) einen instabilen blauen Komplex bildet, der als Maß für die Proteinkonzentration gilt. Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.5.5 SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde das diskontinuierliche Elektrophorese-System nach Lämmli verwendet (Laemmli, 1970). In diesem System werden Proteine zunächst in einem Sammelgel fokussiert und anschließend im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt. Dies gelingt durch das im Proben- und Laufpuffer enthaltene SDS, welches die Proteine denaturiert und sie proportional zu ihrem Molekulargewicht negativ auflädt. Der in dieser Arbeit verwendete Probenpuffer enthielt zusätzlich Dithiothreitol (DTT), das für die Spaltung von Disulfidbrücken und somit zur Auflösung der Quartärstrukturen verantwortlich ist. Wird nun im Gel ein Stromfluss erzeugt, wandern die Proteine zum Pluspol und werden in einem Molekularsieb aus Acrylamidpolymeren in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Zur Vorbereitung wurden die Proben zunächst 5 min bei 95°C in Probenpuffer denaturiert anschließend 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Polyacrylamid-Gele wurden nach Molecular Cloning in einer Prozentigkeit von

8 - 15 % hergestellt. (Sambrook, 2001). Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsstandard (Page Ruler, Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese wurde zunächst für etwa 30 min bei 80 V durchgeführt bis die Proben das Trenngel erreicht hatten. Anschließend wurde die Spannung auf 180-200 V für weitere 2 h erhöht bis die Bromphenolblaulauffront aus dem Gel herausgelaufen war. Die Gele wurden daraufhin mittels Coomassie gefärbt oder für den Western Blot vorbereitet.

3x Probenpuffer für SDS-PAGE

6 % (w/v) SDS
30 % (w/v) Glycerin
150 mM Tris-HCl (pH 6,8)
0,02% (w/v) Bromphenolblau

Laufpuffer für SDS-PAGE

25 mM Tris-HCl
190 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

3.5.6 Western-Blot

Im Anschluss an eine SDS-PAGE wurden die im PA-Gel enthaltenen Proteine mittels des semi-dry Western-Blot Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Burnette, 1981). Der Aufbau erfolgte wie in Abb. 3.2 dargestellt, mit dem Unterschied, dass statt zwei Whatman-Papieren je ein dickes verwendet wurde. Für den Transfer der Proteine wurde, je nach Größe des Proteins und Anzahl der Blots, für 45-60 min eine Spannung von 12 V bei max. 400 mA angelegt. Eine erste Kontrolle des Transfers konnte durch Färbung der Membran mit Ponceau-Rot vorgenommen werden. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT oder alternativ bei 4°C über Nacht in 5 %

Magermilchpulver/PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit PBS wurde die Membran entweder für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht mit Primärantikörper (siehe 2.5. 7)

inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreifach für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe unten) für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde mit einem letzten dreimaligem Waschschrift mit PBS entfernt und es erfolgte die Detektion der Proteine mit Hilfe des

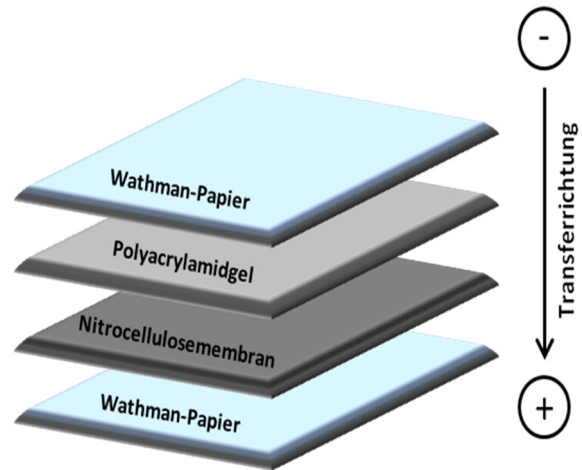


Abb. 3.2 Aufbau Western-Blot

"SuperSignal West Dura Extended

Duration Substrate"-Kit von Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA). Dazu wurden 200 µL einer Luminol-haltigen Lösung mit 200 µL einer Enhancer-Lösung und 200 µL PBS gemischt und auf der Membran verteilt. Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgte mit Hilfe des ChemiLux-Imagers. Eine densitometrische Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Programms LabImage 1D.

Transferpuffer für Western-Blot

48 mM	Tris-HCl
39 mM	Glycin
0,04% (w/v)	SDS
20%	Methanol

Ponceau-Rot Färbelösung

0,1% (w/v) Ponceau S

1% Essigsäure

Blocklösung für Western-Blot

5% (w/v) Milchpulver

in PBS

3.5.7 Verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	pk/mk	Hersteller	Verdünnung
Erstantikörper					
β-Catenin	-	Kaninchen	pk	Sigma	1:300
Caveolin-1	060	Maus	mk	BD	1:400
CD-29	-	Maus	mk	BD	1:300
E-Cadherin	-	Maus	mk	BD	1:300
Galectin-3	169	Kaninchen	pk	Prof. H.P. Elsässer	1:500
GAPDH	1D4	Maus	mk	Clontech	1:300
GFP	JL-8	Maus	mk	Clontech	1:500
GFP (full length)	-	Kaninchen	pk	BD	1:500
gp80	-	Ziege	pk	Santa Cruz	1:300
gp114	-	Kaninchen	pk	Prof. A. Le Bivic	1:4000
Lamin	-	Kaninchen	pk	Santa Cruz	1:400
α-Tubulin	YL1/2	Maus	mk	Santa Cruz	1:500
Villin	-	Kaninchen	pk	S. Rubunic	1:500
HRP gekoppelte Erstantikörper					
LDH mit HRP	-	Ziege	pk	Abcam	1:1000
Zweitantikörper					
Kaninchen-IgG	-	Ziege	pk	Invitrogen	1:2000
Maus-IgG	-	Ziege	pk	Invitrogen	1:2000
Ziege-IgG	-	Esel	pk	Santa Cruz	1:2000

3.5.8 Coomassiefärbung R-250

Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der sich an basische Aminosäuren anlagert und somit Proteine unspezifisch färbt. Mit Coomassie R-250 lassen sich Proteine im Polyacrylamidgel detektieren, die in einer Konzentration von $\geq 0,1 \mu\text{g}/\text{Bande}$ vorliegen.

Färbelösung: 50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,06% Coomassie R250

Entfärbelösung: 20% Methanol, 10% Essigsäure

Die Gele wurden 45 min bei RT in der Färbelösung gefärbt und anschließend durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung entfärbt.

3.5.9 TGN-Exit

Proteine im klassischen sekretorischen Weg können während ihres Transports durch ER und Golgi-Apparat in diesen Kompartimenten festgehalten werden (Ladinsky *et al.*, 2002). Der Proteintransport zwischen *cis*- und *trans*- Golgi-Kompartiment ist bei 15 °C nicht mehr funktionsfähig. Bei 20°C verweilen die Proteine im *trans*-Golgi-Netzwerk. Um eine Arretierung von dem in dieser Arbeit im Fokus stehenden Protein, Galectin-3, zu erreichen, wurden Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und zweimal 10 min bei 37°C mit 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Trypsin in Medium (\emptyset FKS, \emptyset PSG) inkubiert, um die Interaktion von extrazellulärem Galectin-3 mit Glykokonjugaten auf der Zelloberfläche zu verhindern. Nach einem weiteren PBS Waschschrift erfolgte der TGN-Block in Vollmedium für 4 h bei 20°C. Nach 2 h TGN-Block wurde das Medium gegen Vollmedium mit 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Cycloheximid ausgetauscht, um eine Proteinneusynthese zu verhindern. Alle bis zu diesem Zeitpunkt synthetisierten Proteine sammeln sich dadurch im TGN. Durch anschließende Kultivierung der Zellen auf 37°C werden alle Proteine wieder aus dem TGN entlassen. Die Zellen wurden nach 0 min, 60 min und 120 min gesammelt und anschließend für eine Membranfraktionierung verwendet.

3.6 Spezielle Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Herstellung von rekombinantem Galectin-3

Zur Untersuchung der Endozytose und des Recyclings von Galectin-3 sowie zur Herstellung einer Galectin-3-Affinitätssäule wurde humanes rekombinantes Galectin-3 aus einem *E. coli* Stamm aufgereinigt. Zur Produktion wurden BL-21 (DE3-) Bakterien (New England Biolabs, Ipswich (USA)), die bereits mit pET3c-Gal-3 transformiert waren (freundlicherweise von Hakon Leffler, Lund, Schweden zur Verfügung gestellt), verwendet. In diesem *E. coli* Stamm ist das Gen für die T7 DNA-Polymerase unter Kontrolle eines *lac*-Promotors integriert. Diese sorgt nach Induktion mit Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) für die Expression des gewünschten Proteins. Weiterhin zeichnen sich BL-21 (DE3)- Bakterien durch das Fehlen der *lon*- und der *ompT*-Protease aus, was der ungewollten Degradation des Proteins in der Bakterienzelle vorbeugt. Die Bakterien wurden aus einem Tiefkühlstock auf eine LB-Agar-Platte mit Ampicillin ausgestrichen. Gewachsene Kolonien wurden zur Animpfung von 200 mL LB-Medium (+ Ampicillin) verwendet. Nach Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator über Nacht wurden mit dieser Vorkultur 2 L LB-Medium (+ Ampicillin) angeimpft. Nach Erreichen einer OD₂₈₀ von 0,5 wurde die Proteinexpression mit 1 mL 1M IPTG induziert. Die Bakterien wurden weitere 4 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert, anschließend durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 15 min pelletiert und in 20 mL ME-PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Liquidizer aufgeschlossen und Zelldebris durch Zentrifugation bei 4500 rpm bei 4°C für 30 min entfernt. Der Überstand wurde auf 1,5 mL Lactosylsepharose-Beads (EY Laboratorie, san Mateo (USA)) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert, um eine Bindung von Galectin-3 an die Beads zu ermöglichen. Die Beads wurden vorher 5 x mit 10 mL ME-PBS gewaschen. Am nächsten Tag wurden die Beads 2x mit 5 mL ME-PBS gewaschen und das rekombinante Galectin-3 durch Inkubation in 5 mL 150 mM Lactose in ME-PBS für 1,5 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler eluiert. Der Überstand wurde anschließend nach Anleitung des Herstellers über eine PD-10 Säule (GE Healthcare, Little Chalfont (UK)) in PBS umgepuffert und durch Zentrifugation bei

4000 rpm bei 4 °C in Amicon Ultra 10K (Millipore, Billerica (USA)) auf ca. 2,5 mL eingeeengt. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm und anschließender Berechnung mit folgender Formel bestimmt:

$$\frac{A_{280} \cdot \text{Verdünnung} \cdot \text{MW [Da]}^{*1}}{\epsilon^{*2}} = \beta \text{ [mg/mL]}$$

*1: ohne Multiplikation mit MW ergibt sich c [M]

*2: der Absorptionskoeffizient wurde durch Eingabe der Sequenz bei ProtParam (www.expasy.org) bestimmt. Für Galectin-3 beträgt er: 35870.

Neben rekombinantem Galectin-3 wurden für die Bindungsstudie Galectin-3-Mutanten mit der gleichen Methode aufgereinigt. Dabei handelt es sich um die Kohlenhydratbindungsdomäne von Galectin-3 fusioniert mit Thioredoxin (TrxGal-3- ΔN) und ohne Thioredoxin (Gal3-ΔN), die ebenfalls schon in BL-21 (DE3-) Bakterien transformiert mit pET3c-Gal-3 vorlagen (bereitgestellt von Hakon Leffler, Lund, Schweden) (Diehl *et al.*, 2009).

ME-PBS

2 mM EDTA
4 mM β-Mercaptoethanol
in PBS

LB-Medium

1 % (w/v) Bacto-Trypton
0,5 % (w/v) Bacto-Yeast-Extract
1 % (w/v) NaCl

LB-Agar

LB-Medium mit:

1,5 % (w/v) Bacto-Agar

100 µg/ mL Ampicillin

3.6.2 Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten Proteinen

Für *in vivo* Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS wurden rekombinantes Galectin-3, Galectin-3-ΔN und Cholera toxin Untereinheit B (Sigma Aldrich, München) mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Dadurch war sowohl eine Lebendzellbeobachtung, als auch eine Unterscheidung vom jeweiligen endogenen Protein möglich. Für die Markierung wurden die Farbstoffe Alexa-488, Alexa-647 und pHrodo, ein pH-sensitiver Farbstoff, verwendet (alle von Invitrogen, Carlsbad (USA)). Die Konjugation erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Unterschied, dass bei der Trennung von unkonjugiertem Farbstoff von konjugiertem Protein anstelle der mitgelieferten Säule eine PD-10 Säule verwendet wurde. Die Proteinkonzentration und die Markierungseffizienz wurden anhand folgender Formeln berechnet:

Proteinkonzentration Gal-3-A488:

$$c[M] = \frac{[A_{280} - (A_{494} \cdot 0,11)] \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\epsilon}$$

Proteinkonzentration Gal-3-A647 bzw. Cholera toxin *Subunit B*:

$$c[M] = \frac{[A_{280} - (A_{650} \cdot 0,03)] \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\epsilon}$$

Proteinkonzentration Gal-3-pHrodo:

$$c[M] = \frac{[A_{280} - (A_{560} \cdot 0,12)] \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\epsilon}$$

Markierungseffizienz Gal-3-A488:

$$\text{Mol Farbstoff/Mol Protein} = \frac{A_{494} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{71.000 \cdot c[M]}$$

Markierungseffizienz Gal-3-A647 bzw. Cholera toxin Untereinheit B:

$$\text{Mol Farbstoff/Mol Protein} = \frac{A_{650} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{239.000 \cdot c[M]}$$

Markierungseffizienz Gal-3-phrodo:

$$\text{Mol Farbstoff/Mol Protein} = \frac{A_{560} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{65.000 \cdot c[M]}$$

3.6.3 Herstellung einer Affinitätssäule mit rekombinantem Galectin-3

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Bindungspartner von Galectin-3 mit Hilfe einer Affinitätssäule isoliert werden. Dabei wurden Zelllysate von RC-124 und RCC-FG1 Zellen verwendet. Zur Herstellung der Säule wurde rekombinantes Galectin-3 mittels einer PD-10-Säule in Kopplungspuffer umgepuffert und mittels Amicon Ultra 10K auf 2 mL (5 mg/mL) eingeeengt. Das rekombinante Protein wurde an eine *Hi-Trap NHS-activated HP* Säule (GE Healthcare, Uppsala (Schweden)) gekoppelt. Der gesamte Kopplungsprozess wurde bei RT durchgeführt und die Säule an eine Peristaltikpumpe mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min angeschlossen. Vor der Kopplung des Proteins wurde das in der Säule befindliche Isopropanol zunächst durch Spülen mit 6 mL 1 mM HCl ausgewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 6 mL eiskaltem PBS gewaschen und die Lösung mit rekombinantem Protein aufgetragen. Nach 30 min Zirkulation der Protein-Lösung wurde die Säule verschlossen und für 30 min bei RT inkubiert.

Die Kopplungseffizienz wurde über eine A_{280} Messung des bei der Kopplung freigesetzten N-Hydroxysuccinimid bestimmt. Dazu wurden 3 mL Kopplungspuffer auf die Säule gegeben und dieser aufgefangen (Waschfraktion). Anschließend wurden 0,5 mL davon mit 2 mL Puffer C auf eine

PD-10-Säule (äquiliert mit Puffer C) gegeben und der Durchfluss verworfen. Danach wurde mit 1,5 mL Puffer C eluiert und die Absorption bei 280 nm gemessen.

Die Menge an gebundenem Galectin-3 wurde mit folgender Formel berechnet:

Geladene Kopplungslösung: $A = A_{280 \text{ Kopplungslösung}} \cdot V_{\text{Kopplungslösung}}$

Menge nicht gebundenes Protein:

$$B = \frac{A_{280 \text{ Kopplungslösung nach PD-10 Lauf}} \cdot 1,5 (V \text{ Puffer C von PD-10 eluiert}) \cdot V_{\text{Waschfraktion}}}{0,5 (V \text{ Waschfraktion auf PD-10 geladen})}$$

$$\text{Kopplungseffizienz (\%): } \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Vor der Beladung der Säule mit Zelllysate erfolgte eine Deaktivierung überschüssiger aktiver Gruppen an der Säule, die kein Protein gebunden haben und überschüssiges nicht gebundenes Galectin-3 wurde ausgewaschen. Dazu wurde die Säule abwechselnd mit 6 mL Puffer A und B gewaschen, 30 min bei RT in Puffer A inkubiert und zuletzt nochmals abwechselnd mit beiden Puffern gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift mit Puffer B wurde die Säule mit Zelllysate beladen oder bis zur weiteren Verwendung in 2 mL 0,05 M (w/v) Na_2HPO_4 + 0,1 % NaN_3 haltigem Puffer, pH 7 bei 4 °C gelagert.

Kopplungspuffer

0,2 M (w/v) NaHCO_3

0,5 M (w/v) NaCl

pH 8,3

HCl-Waschpuffer

1 mM HCl

Puffer A

0,5 M Ethanolamin
 0,5 M NaCl
 pH 8,3

Puffer B

0,1 M Natriumacetat
 0,5 M NaCl
 pH 4,0

Puffer C (Äquilibrierungspuffer)

0,1 M NaH_2PO_4
 0,15 M NaCl
 pH 7

3.6.4 Isolierung von Galectin-3 Bindungspartnern aus RC-124 und RCC-FG1 Zellen

Für die Isolation von Galectin-3 Bindungspartnern wurden RC-124 und RCC-FG1 Zelllysate (siehe 3.5.1 *Herstellung von Zelllysaten*) verwendet. Die Säule wurde an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und die Flussrate auf ≤ 1 mL/min eingestellt. Alle Schritte wurden mit eiskalten Lösungen und bei 4°C durchgeführt. Nach erfolgreicher Kopplung von Galectin-3 an eine *Hi-Trap NHS-activated HP* Säule wurde diese zunächst 30 min mit eiskaltem PBS gespült. Das Zelllysate wurde 1:20 mit PBS verdünnt und zunächst für 30 min über die Säule zirkulieren lassen. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation ohne eingeschaltete Pumpe. Die Säule wurde dann 30 min mit eiskaltem PBS gewaschen und die Waschfraktionen á 500 µL gesammelt. Die an Galectin-3 gebundenen Liganden wurden mittels 150 mM Lactose in PBS von der Säule eluiert und in Fraktionen á 500 µL aufgefangen. Die Säule wurde zur Lagerung 30 min mit PBS gewaschen und wie in 3.6.4 beschrieben

aufbewahrt. Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen sowie der Waschfraktionen wurden mittels der Absorption bei 280 nm mit Hilfe einer ÄKTA bestimmt und Bindungspartner anschließend mittels ESI-MS/MS identifiziert.

3.6.5 Oberflächenbiotinylierung

Zur Untersuchung der Transportkinetik spezifischer Transmembranproteine wurden diese mittels Oberflächenbiotinylierung von der apikalen und basolateralen Plasmamembran isoliert. Bei dieser Methode werden die Zellen mit einem membranundurchlässigen Biotin-Derivat inkubiert, das alle peripheren Proteinbestandteile durch Bindung an deren primäre Aminogruppen verknüpft. Anschließend können die Oberflächenproteine durch Ausnutzung der Avidin/Biotin-Wechselwirkung mittels Neutravidinbeads aus dem Lysat isoliert werden.

Für die Durchführung wurden 7 Tage alte auf PET Filtern im 6 Loch-Format kultivierte MDCK-Zellen verwendet. Die Zellen wurden dreimal mit PBS++ gewaschen und anschließend nur die apikale oder basolaterale Seite mit Sulfo-NHS-LC Biotin (Thermo Scientific, Rockford (USA); 1,2 mg/mL in PBS++; Stock: 400 mg/mL in DMSO) für 30 min bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Die jeweils andere Filterseite wurde währenddessen mit PBS++ inkubiert. Überschüssiger *Crosslinker* wurde durch dreimaliges Waschen mit 0,1 M Glycin in PBS++ beseitigt. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschschriff mit PBS++ und die 6 Loch Schale wurde über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen von dem Filter abgelöst und in 0,5 mL Puffer 1 (ohne BSA, auf 37 °C vorgewärmt) mit 10 µL PI in ein Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Lyse wurde für 30 min bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler durchgeführt, Zelldebris für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C pelletiert und 50 µL des Überstandes als Lysatprobe abgenommen und mit 3x SDS-Probenpuffer gemischt. Der restliche Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß mit vorbereiteten Neutravidinbeads gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Pro Probe wurden am Vortag 60 µL

Neutravidinbeads (Pierce, Rockwell (USA)) mit 1 mL Puffer 1 (mit BSA) gemischt und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads zweimal mit 1 mL Puffer 1 (mit BSA) gewaschen und jeweils für 2 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde jeweils 1 µL PI und 10 µL 10% (w/v) BSA an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert bevor die Probe aufgetragen wurde. Nach Inkubation über Nacht wurden die Proben mit den Beads in Mobicols (MoBiTec, Göttingen) überführt und je einmal mit Puffer 1 (mit BSA) bis Puffer 4 gewaschen. Zur Elution der Proteine wurden die Mobicols mit einer Kappe verschlossen, die Beads in 40 µL 2x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C inkubiert und die Proteine durch Entfernen der Kappe und anschließender Zentrifugation bei 6000 rpm aus den Mobicols eluiert.

Puffer 1

20 mM	Tris
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
1 % (v/v)	Triton X-100
(0,2 % (w/v)	BSA)
pH 8,0	

Puffer 2

20 mM	Tris
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
0,5 % (v/v)	Triton X-100
0,1 % (w/v)	SDS
0,2 % (w/v)	BSA
pH 8,0	

Puffer 3

20 mM	Tris
500mM	NaCl
0,5 % (v/v)	Triton X-100
0,2 % (w/v)	BSA
pH 8,0	

Puffer 4

50mM	Tris
pH 8,0	

3.6.6 Co-Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation können Interaktionspartner eines Proteins nachgewiesen werden. Dazu wird die zu untersuchende Probe mit einem Antikörper gegen ein bekanntes Zielprotein inkubiert. Dadurch kommt es zur Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes, der auch Proteine, die mit dem bekannten Protein interagieren, beinhaltet. Um diesen Komplex aus der Gesamtprobe zu isolieren, werden Protein A oder G gekoppelte Sepharose-Kügelchen (PAS bzw. PGS) verwendet, die Antikörper reversibel über ihre Fc-Domäne binden können. Die Antikörper und daran assoziierte Proteine lassen sich anschließend durch Zentrifugation von dem restlichen Zelllysate trennen.

Zur Durchführung wurden pro Ansatz Zelllysate aus sechs 10 cm Schalen mit RC-124, RCC-FG1 oder MDCK_{p75GFP} Zellen verwendet (siehe 3.5.1 *Herstellung von Zelllysaten*). Alle Schritte wurden auf Eis (4°C) durchgeführt. Nach Entfernung der Zelldebris wurden 50 µL Überstand als Lysatprobe entnommen und mit 3x SDS-Probenpuffer gemischt. Der restliche Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler mit 30 µL PAS bzw. PGS inkubiert. Durch dieses *Preclearing* sollten alle Proteine, die unspezifisch an Sepharose-Beads binden und somit falsch positive Ergebnisse hervorrufen, entfernt werden. Anschließend wurden die

Beads für 2 min bei 6000 rpm abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler mit dem spezifischen Antikörper inkubiert. Nach Zugabe von 50 µL PAS bzw. 70 µL PGS erfolgte eine Inkubation schüttelnd bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Beads je zweimal mit 0,1 % (v/v) NP-40 in PBS und PBS gewaschen und der gebundene Antikörper-Ligand-Komplex mit 50 mL 1x SDS-Probenpuffer durch 5 min bei 95°C und anschließender Zentrifugation bei 1000 rpm für 30 s von den Beads eluiert.

Für Co-IPs mit humanem Nierengewebe wurden nach Nephrektomie Gewebeteile aus der normalen Niere und des Tumors entnommen und in 10 mL Co-IP-Lysisbuffer mit 500 µL PI aufgenommen. Das Gewebe wurde in einem Potterröhrchen durch 10-15 langsame *Strokes* bei 250 rpm mit einem *Douncer* homogenisiert, anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Zelldebris und intakte Zellen wurden bei 4500 rpm für 5 min bei 4°C pelletiert. 1 mL Überstand wurde als Lysatprobe entnommen und mit 3x SDS-Probenpuffer gemischt. Der restliche Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 200 µL PAS versetzt. Nach dem *Preclearing* für 1 h bei 4°C wurden die Beads bei 4000 rpm für 5 min pelletiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler mit 4,5 µL Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 µL PAS-Beads zugegeben und weitere 2 h schüttelnd bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4000 rpm für 2 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und die Beads 2x mit 0,1 % (v/v) NP-40 in PBS und anschließend 4 x mit PBS gewaschen. Die Proteine wurden mittels 60 µL 3x SDS-Probenpuffer bei 95 °C für 5 min von den Beads eluiert und anschließend mittels Western-Blot analysiert.

Verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	pk/mk	Hersteller	Verdünnung	PAS/ PGS
Galectin-3	169	Kaninchen	pk	Prof. H.P. Elsässer	4,5 µL/9000 µL	PAS
Galectin-3	169	Kaninchen	pk	Prof. H.P. Elsässer	1 µL/500 µL	PAS

3.6.7 Esi-MS/MS

Mit Hilfe des Esi-MS/MS (*Electrospray-Ionization Tandem Mass Spectrometry*) Verfahrens können generell Proteine identifiziert werden. Zur Identifikation von Interaktionspartnern wurden Zelllysate der RC-124 und RCC-FG1 Zelllinie hergestellt (*siehe 3.5.1 Herstellung von Zelllysaten*) und anschließend über eine Galectin-3-Affinitätssäule auf Bindungspartner untersucht (*siehe 3.6.4 Isolierung von Galectin-3-Bindungspartnern aus RC-124 und RCC-FG1 Zellen*). Die Eluate wurden anschließend mit Hilfe eines LTQ-FT Massenspektrometers (Thermo Fischer Scientific) mit einer Auflösung von 100.000 in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Uwe Linne mit Unterstützung von Herrn Dr. Stefan Baumeister an der Philipps-Universität Marburg untersucht.

3.6.8 Fluoreszenzpolarisation

Mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation kann die Interaktion zwischen zwei Molekülen in Lösung bestimmt werden. Das Prinzip der Messung beruht auf dem Einsatz von zwei Polarisationsfiltern, die sich im Exzitations- und Emissions-Strahlengang eines Fluoreszenz Spectrophotometers befinden. Dabei ist der erste Filter für die Erzeugung von linear polarisiertem Licht zuständig, das anschließend auf die Probe fällt. Mit dem zweiten Filter wird die Intensität des Emissionslichts bei zwei Stellungen des Filters relativ zur Stellung des Polarisators analysiert.

Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung rotieren Moleküle in Lösung. Dabei ist die Bewegung von kleinen Molekülen schneller als die von großen Molekülen. Wird ein kleines fluoreszierendes Molekül in Lösung mit linear polarisiertem Licht angeregt, wird das emittierte Licht depolarisiert (Abb. 3.3). Bindet dieses Molekül an einen Interaktionspartner verlangsamt sich die Rotationsbewegung und das emittierte Licht ist weniger depolarisiert. Durch Titration eines Interaktionspartners des fluoreszierenden Moleküls und die Analyse des emittierten Lichts kann die Dissoziationskonstante der beiden Moleküle bestimmt werden (Kakehi *et al.*, 2001).

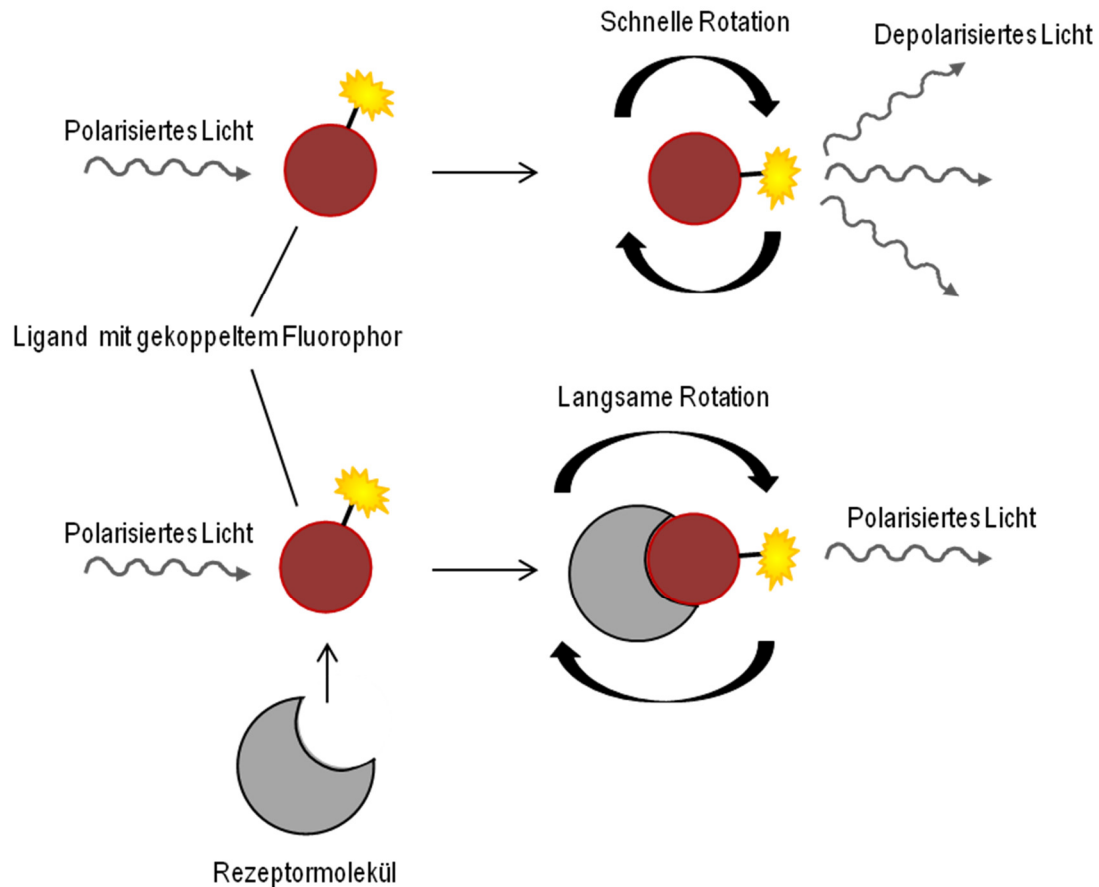


Abb. 2.3 Fluoreszenzpolarisation

Ein kleines Fluoreszenz gekoppeltes Molekül weist in Lösung eine schnelle Rotationsbewegung auf. Fällt polarisiertes Licht auf dieses Molekül wird durch die schnelle Bewegung depolarisiertes Licht emittiert. Bindet nun ein Rezeptor an diesen Liganden kommt es zur Verlangsamung der Rotationsbewegung und zur Veränderung der Depolarisation des emittierten Lichts.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzpolarisationsstudien sollten Dissoziationskonstanten von Galectin-3 mit unterschiedlichen Liganden in Abhängigkeit des pH Wertes ermitteln. Als Liganden wurden 2`Fucosyllactose (FucLac) und das Blutgruppen Glycan A-tetra (A-Tetra) verwendet. Beide waren über einen Ethylamin *Linker* mit Fluorescein gekoppelt. Außerdem wurde Asialofetuin (Sigma Aldrich) als Inhibitor verwendet. Galectin-3 wurde wie in 3.6.1 beschrieben hergestellt. Die Fluoreszenzpolarisationsmessung wurde mit einem Polar Star PHERAstar FS (BMG LABTECH, Offenburg) mit der Software

Mars Version 2.10 R3 durchgeführt. Die Exzitationswellenlänge betrug 485 nm und die Emission wurde bei 520 nm gemessen. Jede Messung wurde auf die Fluoreszenzintensität des jeweiligen freien Liganden bezogen. Für jeden pH Wert wurden feste Konzentrationen des Liganden (0,1 μ M) oder Inhibitors (10 μ M ASF) eingesetzt und mit einer Konzentrationsreihe (0,1 - 10 oder 50 μ M) von Galectin-3 in einem Endvolumen von 200 μ L gemischt.

Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Tobias von Mach durchgeführt.

3.7 Zellbiologische Methoden

3.7.1 Isolation von Zellkernen

Zur näheren Untersuchung der Galectin-3 Expression und Lokalisation in Epithelzellen der humanen Niere und in Tumorzellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms, wurden Zellkerne vom Zytosol der Zelle getrennt. Für diese Isolation wurden zum einen RC-124 und RCC-FG1 Zellen, auf 10 cm Schalen gewachsen und sechs Tage alt, verwendet und zum anderen Gewebeproben aus der normalen Niere und aus dem Tumorgewebe sofort nach Nephrektomie. Sämtliche Puffer wurden auf 4°C vorgekühlt und die Kernisolation wurde modifiziert nach dem Protokoll von Madej (Madej *et al.*, 2003) auf Eis durchgeführt. Zu Beginn der Isolation wurde das Gewebe in 2 mL STM Puffer mit PI mit Hilfe des *Douncers* homogenisiert bzw. wurden pro Ansatz vier konfluente Platten mit Zellen in 2 mL STM Puffer mit PI aufgenommen und durch mehrmaliges Pipettieren mit einer blauen Pipettenspitze lysiert. Nach anschließender Zentrifugation der Homogenate bzw. Lysate bei 3000 rpm für 10 min bei 4°C wurde der Überstand gesammelt (Zytosolfraktion). Das Pellet wurde 2x in je 1 mL STM Puffer + 0,5 % Triton-X-100 gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde für 10 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 400 μ L KSTM Puffer + 20 % Glycerol resuspendiert. Anschließend erfolgte der Kernaufschluss mittels Ultraschallbehandlung und die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert und alle 5 min kurz gevortext.

Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 11000 rpm bei 4°C wurde der Überstand mit den darin befindlichen löslichen Proteinen abgenommen und bis zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot bei - 80 °C gelagert.

STM Puffer

0,25 M (w/v)	Sucrose
20 mM (w/v)	Tris-HCl
3 mM (w/v)	MgCl ₂
pH 7,85	

KSTM Puffer

0,25 M (w/v)	Sucrose
20 mM (w/v)	Tris-HCl
3 mM (w/v)	MgCl ₂
0,4 M (w/v)	KCl
5 mM (w/v)	DTT
pH 7,85	

3.7.2 Endozytose von rekombinanten Proteinen

Die Untersuchung von Endozytosebedingungen und des Recyclings von Galectin-3 ist mit Hilfe von endogenem Protein nur eingeschränkt möglich. Deshalb wurde für diese Versuche exogen zugegebenes rekombinantes Protein verwendet. Für einen Teil der Endozytoseversuche wurde rekombinantes Galectin-3 und Cholera toxin Untereinheit B mit einem Alexa-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (siehe 3.6.2 *Fluoreszenzmarkierung von rekombinantem Protein*). Für die Aufnahme des Proteins wurden 5-7 Tage alte konfluente Zellen in 10 cm Schalen oder auf Filtern in 6 oder 24 Loch-Schalen verwendet. Die Zellen wurden zunächst 2x für 30 min bei 37°C mit FKS- und Antibiotika freiem Medium inkubiert. Danach wurden sie 2x mit PBS++ gewaschen und 1,5 µM, 2 µM oder 5 µM rekombinantes Protein in PBS++ zur

apikalen Membran gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 4 °C. Dieser Schritt diente der Anlagerung des Proteins an die Zellmembran und garantierte eine anschließende synchronisierte Aufnahme. Diese erfolgte bei 37 °C für 0-60 min. Je nach Versuch wurde das Protein entweder nach 10-30 min durch PBS++ ersetzt oder für die angegebenen Zeitpunkte auf den Zellen belassen. Der Waschschrift erfolgte entweder mit 150 mM Lactose in PBS oder 0,2 % Essigsäure für 2x 5 min auf Eis und einem anschließenden PBS++ Waschschrift.

Für die Untersuchung der Endozytose von Galectin-3-pHrodo wurden die Zellen 1h mit 60 µg/mL Chloroquin inkubiert und anschließend die Aufnahme des Lectins in Anwesenheit von Chloroquin durchgeführt.

3.7.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die FACS- (*fluorescence activated sorting*) Analyse ist eine Messung von Streu- und/oder Fluoreszenzlicht, das von Einzelzellen in Suspension ausgesendet wird. Suspendierte Zellen werden an einem Laserstrahl vorbeigeführt und mittels Messung der Lichtstreuung können Zellgröße und Granularität bestimmt werden. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht zusätzlich eine Selektion von speziellen Zellen in einem *Zellpool*. In dieser Arbeit wurde die Endozytose von Galectin-3 und Cholera toxin Untereinheit B, welche mit Alexa-647 gekoppelt waren, bei unterschiedlichen pH Werten in MDCK Zellen untersucht. Die Aufreinigung des Lectins und die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgten wie in 3.6.1 und 3.6.2 beschrieben. Für die Durchführung wurden MDCK_{p75GFP} Zellen 5 Tage in 24 Lochschalen kultiviert verwendet. Die Zellen wurden 3x mit PBS++ gewaschen und anschließend wurde eine Aufnahme der Proteine wie in 3.7.2 *Endozytose von Galectin-3* beschrieben, durchgeführt, wobei 2 µM rekombinantes Protein anstatt in PBS++ in EPPS-Puffer, pH 5,9; pH 6,5 oder pH 7,4, auf die Zellen gegeben wurde. Nach 1 h Endozytose bei 37 °C wurden die Zellen 3x PBS gewaschen, für 30 min mit 250µL Trypsin/EDTA inkubiert und anschließend in 500 µL SLB-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden für 3 min bei 6000 rpm

pelletiert und nach der Resuspension in 500 µL SLB-Puffer im FACS (BD Canto II mit BD Diva Software, BD, Heidelberg) nach ihrer Fluoreszenzintensität untersucht.

EPPS-Puffer

125 mM (w/v)	NaCl	
5 mM (w/v)	KCl	
1 mM (w/v)	MgCl ₂	
1 mM (w/v)	CaCl ₂	
in 20 mM (w/v)	EPPS	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfon Säure)
pH 7,4; 6,5; 5,9		

SLB- Puffer

25 mM (w/v)	Hepes
150 mM (w/v)	NaCl
pH 7,4	

3.7.4 DRM-Floating Analyse von MDCK II Zellen

DRMs (Detergenz-resistente Mikrodomänen) sind dicht gepackte Cholesterol-Sphingolipid- und Glycolipid- reiche Membranabschnitte (Kurzchalia *et al.*, 1992). Sie lassen sich mittels Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Zellbestandteilen trennen und zeichnen sich durch ihre Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien bei 4°C aus (Yu *et al.*, 1973). Bei dieser Präparation erfolgte zunächst die Isolation von Membranfragmenten, aus denen dann im Anschluss die DRMs isoliert wurden (Abb. 3.4) (Fiedler *et al.*, 1993). Die gesamte Analyse wurde auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt und alle Lösungen waren mit PI (10µL/mL) versetzt und vorgekühlt. Durch vorherige experimentelle Ansätze war bekannt, dass Saccharose die Bindung von Galectin-3 an seine Liganden beeinflusst. Deshalb wurde für diese Gradienten

Nycodenz, ein nicht-ionisches tri-iodiniertes Derivat der Benzoesäure, als Gradientenmaterial verwendet.

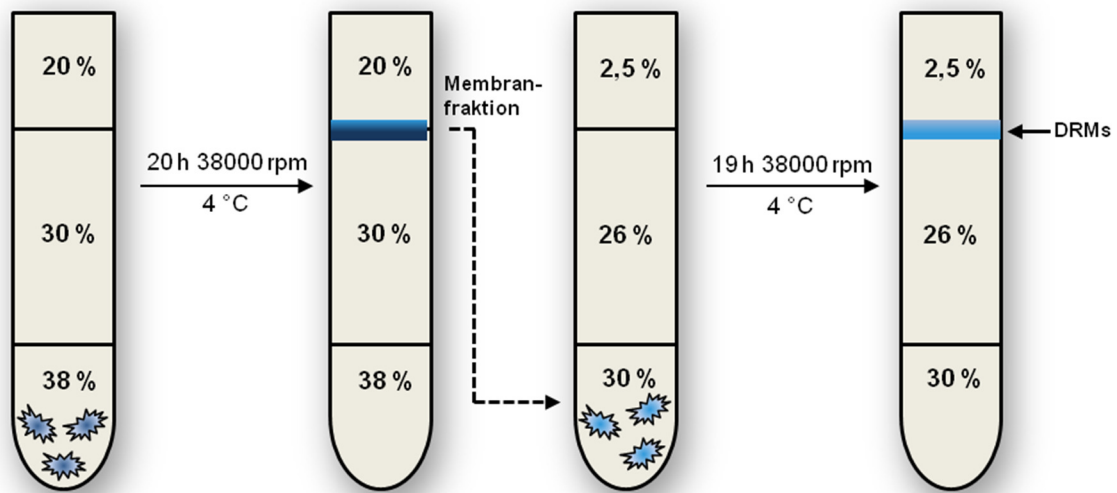


Abb. 3.4 Membranfraktionierung und DRM Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation

Für einen Ansatz wurden 6x 10 cm Schalen mit konfluenten voll auspolarisierten MDCK_{Gal-3YFP} bzw. MDCK_{Gal3-R186S} Zellen verwendet. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, von der Schale gelöst und in 6 mL PBS aufgenommen. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 4 °C wurden sie für 5 min bei 1500 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 mL 5 % Nycodenz in Hepes-Puffer durch Schütteln resuspendiert und anschließend für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 2 mL 5 % Nycodenz gelöst. Durch zehnmaliges auf- und abpipettieren mit einer blauen Mikropipetten-Spitze wurden die Zellen von einander gelöst. Danach wurde die Plasmamembran zerstört durch 15x Aufsaugen in einer 1 mL Spritze mit 26G Kanüle und anschließendem Scheren im Dounce-Homogenisator (10x). Die Suspension wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm von Zelldebris und -kernen befreit. Anschließend wurden 2 mL des perinukleären Überstandes (PNS) in ein Ultrazentrifugen (UZ) -Röhrchen überführt, mit DTT (Endkonzentration 1 mM)

versetzt und mit 2 mL 60 % Nycodenz gemischt. Die Lösung wurde dann mit 6 mL 30 % Nycodenz überschichtet und das Röhrchen mit 2-3 mL 20 % Nycodenz aufgefüllt. Die Phasengrenzen wurden markiert und die Membranfraktionen durch Zentrifugation für 20 h bei 4°C und 38000 rpm im SW-41 Rotor von den restlichen Bestandteilen getrennt. Nach der Zentrifugation konnten die an der Trennschicht zwischen 20 % und 30 % Nycodenz angesammelten Membranfraktionen entnommen werden, und es erfolgte die DRM Isolation. Dazu wurden 3 mL der entnommen Schicht mit den Membranfraktionen in ein neues UZ-Röhrchen überführt, mit TNE-Puffer aufgefüllt, gut gemischt und anschließend für 2 h bei 38000 rpm zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wurde dann in 1,8 mL TNE-Puffer resuspendiert und es folgte die Extraktion mit 200 µL Triton-X-100 (Stocklösung 10 % (v/v)) für 30 min auf Eis. Dadurch wurden die Membranfragmente aufgelöst und Membranproteine solubilisiert. Anschließend wurde die Suspension mit 2 mL 60 % Nycodenz gemischt, mit 6 mL 26 % Nycodenz in TNE-Puffer überschichtet und mit 2-3 mL 2,5 % Nycodenz in TNE-Puffer aufgefüllt. Nach 19 h Zentrifugation bei 38000 rpm konnten 1 mL Fraktionen mit Hilfe einer Peristaltikpumpe abgenommen werden. Die DRMs befanden sich an der Trennschicht zwischen 2,5 % und 26 % Nycodenz, was den Fraktionen 2-5 entsprach. Die Fraktionen wurden anschließend mittels TCA/Aceton gefällt und durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

TNE

25 mM	Tris/HCL
150 mM	NaCL
5 mM	EDTA
pH 7,4	

HEPES

10 mM Hepes/ Na

2 mM EGTA

pH 7,4

60 % Nycodenz

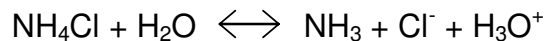
60 g/100mL bidest (nach und nach zugeben, rühren und erhitzen)

Gradientenlösungen

Nycodenz	60 % Nycodenz [mL]	Hepes-Puffer [mL]	TNE-Puffer [mL]
30 %	12,5	12,5	-
20 %	16,7	33,3	-
5 %	3,3	36,7	-
26 %	8,7	-	11,3
2,5 %	0,4	-	9,6

3.7.5 NH₄Cl-Behandlung

In wässriger Lösung zerfällt Ammoniumchlorid (NH₄Cl) unter anderem zu Ammoniak (NH₃):



Die meisten Zellmembranen sind für Ammoniumionen (NH₄⁺) nicht permeabel wohingegen gasförmiges Ammoniak diese leicht passieren kann. Wird extrazellulär eine NH₄Cl-Lösung zu einer Zelle gegeben, dringt NH₃ schnell in diese ein und gelangt in intrazelluläre (saure) Kompartimente. In diesen verbindet es sich mit Wasserstoffionen zu Ammonium, was zur Folge hat, dass der pH Wert dieser Kompartimente ansteigt. Die Änderung des pH Wertes kann mit Hilfe von pH sensitiven Fluorophoren nachgewiesen werden. Zudem können durch die Kopplung eines pH sensitiven Fluorophors an ein Protein Rückschlüsse über die Lokalisation dieses Proteins in sauren Kompartimenten gezogen werden.

Zur Durchführung wurden die Zellen zum einen für 12 h mit 20 mM oder 50 mM NH_4Cl in Vollmedium behandelt (siehe 3.7.6 *Sekretionsassay und Oberflächenbiotinylierung*) oder 20 mM bzw. 50 mM NH_4Cl in PBS++ wurden während der Messung zu den Zellen zugegeben (siehe 3.10.1. *Lebendzellbeobachtung*).

3.7.6 Sekretionsassay und Oberflächenbiotinylierung

Zur Untersuchung des Einflusses von NH_4Cl auf die gp80 Sekretion wurden sechs Tage alte voll auspolarisierte MDCK_{p75GFP} Zellen auf Filtern in 6 Lochschalen verwendet. Die Zellen wurden für 12 h mit 20 mM und 50 mM NH_4Cl +/- 50 mM Lactose in Vollmedium bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen, die Zellen 2x mit PBS++ gewaschen und für weitere 2 h mit 20 mM und 50 mM NH_4Cl +/- Lactose in Medium mit PSG aber ohne FKS und Phenolrot bei 37°C inkubiert (500 µL apikal, 1000 µL basolateral). Anschließend wurde das apikale Medium und 500 µL basolaterales Medium gesammelt, jeweils 10 µL PI zugegeben und vorhandene Zellen und Verunreinigungen durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde in einen Amicon Zentrifugenfilter (*cut off* bei 10 kDa) (Millipore, Billerica, USA) überführt und für 30 min bei 12200 rpm bei 4°C auf 25 µL ankonzentriert. Durch umgekehrtes Einsetzen der Filtereinsätze in neue Reaktionsgefäße und Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 min konnte die Probe eluiert werden. Anschließend wurden 15 µL 3x SDS Probenpuffer zugegeben und die Probe bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die verwendeten Zellen wurden nach Abnahme des apikalen und basolateralen Mediums außerdem auf die Membranverteilung von p75-GFP mittels Oberflächenbiotinylierung untersucht (siehe 3.6.5 *Oberflächenbiotinylierung*).

3.8 Histologie

3.8.1 Gewebeentnahme

Im Rahmen dieser Studie wurden nach Nephrektomie je ca. 1,5 x 1,5 cm große Gewebeproben aus unterschiedlichen Bereichen der Niere entnommen (Abb. 3.5). Bei diesen Bereichen handelte es sich um normales Nierengewebe, den Übergang (Bereich zwischen normalem und Tumorgewebe) und den eigentlichen Tumor. Die Gewebeproben wurden in 20 mL PBS mit 500 µL PI auf Eis transportiert. Anschließend wurden die Proben neben Co-Immunpräzipitation, Western-Blot Analyse und Kernisolations- Studie auch histologisch untersucht.

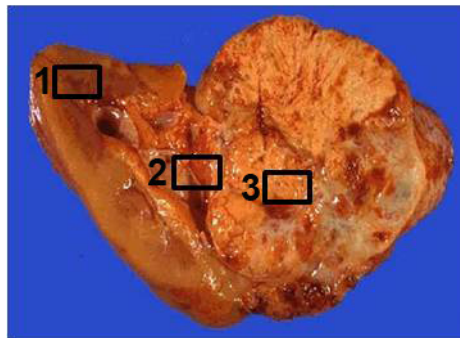


Abb 3.5 Probenentnahme nach Nephrektomie

Nach Entnahme der Niere wurden aus drei unterschiedlichen Bereichen der Niere Gewebeproben entnommen. Dabei handelte es sich um den normalen Nierenbereich (1), den Übergangsbereich (2) und den Bereich des Tumors (3).

Bild: Klinikum Dortmund GmbH, modifiziert.

3.8.2 Fixierung und Paraffineinbettung

Unmittelbar nach Entnahme der Gewebeproben wurden diese für die Histologie zugeschnitten und 24 h in 20 fachem Volumen Carnoy oder Para-Formaldehyd (4 % (w/v) in PBS) fixiert. Nachdem alle Gewebeproben in kleine Einbettkassetten gelegt wurden erfolgte die Entwässerung. Die Carnoy-fixierten Proben wurden bei 4°C über Nacht in 70 % Ethanol entwässert während die Formalin-fixierten Proben für 3 h fließend gewässert und anschließend

ebenfalls bei 4 °C über Nacht in 70 % Ethanol inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Formalin-fixierten Proben zur weiteren Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe zuerst für 2 h in 80 % Ethanol, dann für 2 h in 96 % Ethanol und abschließend mit den Carnoy-fixierten Proben zweimal 2 h in Isopropanol inkubiert.

Neben der Carnoy- und PFA-Fixierung wurde eine Methanolfixierung durchgeführt. Die Gewebeproben wurden dafür für je 30 min in einer aufsteigenden Methanolreihe von 70 - 100 % inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation in Isopropanol.

Alle Proben wurden zur Einbettung über Nacht in einem Paraffinbad (Schmelztemperatur 42 - 44 °C) gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine 6-stündige Inkubation bei 60 °C in einem zweiten Paraffinbad (Schmelztemperatur 51 - 53 °C) und anschließend eine Inkubation über Nacht in Paraplast. Die Proben wurden mit Hilfe eines Einbettautomaten in Paraffin eingebettet wobei der Einbettkassetten als Träger für den Paraffinblock diente.

Carnoy

60 % (v/v) Ethanol
30 % (v/v) Chloroform
10 % (v/v) Eisessig

3.8.3 Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten

Der fertige Paraffinblock wurde in die Haltevorrichtung des Mikrotoms eingespannt und während des Schneidevorgangs mit Eis gekühlt. Die 1 µm dicken Schnitte wurden mit einem feuchten Pinsel von der Klinge abgehoben und in ein Wasserbad (37 - 40 °C) überführt. Das warme Wasser diente zur Streckung und Entfaltung der Schnitte und erleichterte das Aufziehen auf den Objektträger. Die Objektträger mit den fertigen Schnitten wurden über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert und anschließend für die HE-, Azan- oder Immunfluoreszenz-Färbungen verwendet.

3.8.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Untersuchung morphologischer Unterschiede zwischen den Gewebeproben wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) durchgeführt. Die Schnitte wurden vor der Färbung mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert:

Xylol (Rotihistol) I	5 min
Xylol (Rotihistol) II	5 min
Isopropanol	5 min
96 % Ethanol	3 min
80 % Ethanol	3 min
70 % Ethanol	3 min
dH ₂ O	1- 2 min

Anschließend wurden die Schnitte für 3 min zur Kernfärbung in Hämalaun inkubiert und zum „Bläuen“ 10 min unter fließendes Leitungswasser gehalten. Durch Hämalaun färben sich alle sauren Zellbestandteile blau, insbesondere der Zellkern und das raue ER. Durch eine 15-minütige Inkubation in 0,1 % wässrigem, gelblichen Eosin wurden dann alle basischen Zellbestandteile, wie z.B. Zellplasmaproteine, rot gefärbt. Anschließend wurde das Wasser aus dem Schnitt durch eine aufsteigende Alkoholreihe verdrängt und das Präparat mittels Mowiol eingedeckelt.

3.8.5 Azan-Färbung

Bei der Azan-Färbung handelt es sich um eine Trichrom-Färbung aus Azokarmin, Anilinblau und Orange G. Sie dient zur Differenzierung von extrazellulären Bindegewebsfasern, Geweben und Zellbestandteilen. Die Schnitte wurden mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (siehe 2.8.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und anschließend für 10 - 15 min bei 60 °C in Azocarmin inkubiert. Danach wurden sie mit dH₂O gespült, zum Differenzieren in Anilin-Ethanol (100 mL Ethanol + 100 µL Anilin) inkubiert bis die Zellekerne als rote Punkte sichtbar waren und die Reaktion durch Inkubation in

essigsauerm Alkohol (100 mL Ethanol + 1 mL Eisessig) für 1 min gestoppt. Nach erneutem Waschen in a. dest wurden die Schnitte zum Entfärben und Beizen des Bindegewebes für 30 min. - 3 h in 5 % Phosphor-wolframsäure inkubiert und erneut mit dH₂O gewaschen. Anschließend erfolgte die Blaufärbung des Bindegewebes durch Inkubation der Schnitte in Azanlösung für 5 - 45 min bei RT, erneutem Waschen in dH₂O und anschließender Inkubation in 96 % Ethanol bis die Blaufärbung sichtbar wurde. Dann wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert:

Isopropanol	5 min
Xylol (Rotihistol) I	5 min
Xylol (Rotihistol) II	5 min

Abschließend erfolgte die Einbettung in Entellan.

Azanlösung

0,5 g	Anilinblau
2 g	Goldorange G
100 mL	a. dest
8 mL	Eisessig
Kurz aufkochen, filtrieren	

3.9 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenzfärbung dient zur spezifischen Markierung von Proteinen um deren Lokalisation innerhalb der Zelle zu bestimmen. Dabei interagiert ein Antikörper spezifisch mit dem Epitop des zu lokalisierenden Proteins. Anschließend wird dieser Primärantikörper durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert und für die Mikroskopie sichtbar gemacht. Die an den Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe werden im

Mikroskop durch entsprechende Exzitationswellenlängen angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Emissionswellenlänge.

3.9.1 Immunfluoreszenzfärbung am Gewebe

Vor jeder Färbung wurden die Schnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (siehe 3.8.4 *Hämatoxin-Eosin-Färbung*) und anschließend für 3x 5min in PBS gewaschen. Die Objektträger wurden getrocknet. Danach erfolgte das Blocken mit 10 % (v/v) Ziegenerum in PBS für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer. Zur Herstellung einer Negativkontrolle wurde das Ziegenerum auf einem Schnittpräparat belassen. Die übrigen Präparate wurden mit dem Primärantikörper in 10% (v/v) Ziegenerum in PBS über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper sowie das Ziegenerum verworfen, die Präparate 3x 5 min in PBS gewaschen und anschließend 60 min bei RT in einer feuchten Kammer mit dem Sekundärantikörper in 10 % Ziegenerum inkubiert. Nach Abspülen des Primärantiköpers erfolgte die Kernfärbung durch Hoechst 33342 (0,5 µg/mL (w/v) in PBS) für 5 min bei RT. Zuletzt wurden die Präparate 2x 5 min in PBS gewaschen, einmal in dH₂O gepült und mittels Mowiol eingedeckelt. Die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper sind in 3.9.5 *Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper* aufgelistet.

3.9.2 Immunfluoreszenzfärbung an Zellen

Die für die Immunfluoreszenz verwendeten Zellen wurden auf Deckgläschen oder Filtern kultiviert. Die Zellen wurden zunächst 3x mit PBS++ gewaschen und entweder je nach Färbung für 6 min mit -20°C kaltem Methanol oder für 20 min bei RT mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden sie erneut 3x mit PBS++ gewaschen und in eine feuchte Kammer überführt, wo alle weiteren Schritte vollzogen wurden. Die PFA fixierten Proben wurden dann für 20 min bei RT mit 0,025 % (w/v) Saponin in PBS permeabilisiert und erneut mit PBS++ gewaschen. Anschließend erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei RT für die PFA fixierten Proben in 0,025 % (w/v) Saponin + 1 % (w/v) BSA in PBS und für die Methanol fixierten Proben in 1 % (w/v) BSA in

PBS. Nach dem Blocken wurden die Zellen erneut 3x mit PBS++ gewaschen und für 1 - 2 h bei RT mit dem Erstantikörper in PBS oder für die PFA fixierten Proben in 0,025 % (w/v) Saponin + 1 % (w/v) BSA in PBS inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Proben für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper in PBS oder für die PFA fixierten Proben in 1 % (w/v) BSA in PBS behandelt. Nach einem erneuten PBS Waschschrift erfolgte die Kernfärbung für 6 min bei RT mit Hoechst 33342 (0,5 µg/mL (w/v) in PBS++) und die Proben wurden anschließend mittels Mowiol eingedeckelt. Bei einer Filterfärbung wurden diese ausgeschnitten und kopfüber auf einen Objektträger gelegt und mittels Mowiol eingedeckelt. Die Präparate wurden bis zur Untersuchung unter dem Mikroskop bei 4 °C gelagert.

Die Antikörperversdünungen sind in 3.9.5 *Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper* aufgelistet.

3.9.3 Immunfluoreszenzfärbung für die GSDIM-Mikroskopie

Für die GSD-Mikroskopie wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Die Färbung wurde wie oben beschrieben (siehe 3.9.2 *Immunfluoreszenzfärbung an Zellen*) durchgeführt mit den Unterschieden, dass bei jedem PBS Waschschrift 5 x gewaschen wurde und der Erstantikörper 2 h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert wurde. Außerdem erfolgte keine Färbung der Zellkerne und die Proben wurden nicht mit Mowiol eingedeckelt, sondern bei 4 °C in PBS gelagert.

3.9.4 Vorbereitung von Zellen ohne Immunfluoreszenzfärbung

In dieser Studie wurden auch Zellen mikroskopisch untersucht, die keine Immunfluoreszenzfärbung erhielten, da sie ein stabil transfiziertes Protein mit Fluoreszenzmarker besaßen. Diese Zellen wurden auf Deckgläschen oder Filtern kultiviert und zur mikroskopischen Untersuchung wie oben beschrieben mit 4 % PFA fixiert, mit 0,025 % (w/v) Saponin in PBS permeabilisiert und der Zellkern mittels Hoechst 33342 gefärbt. Das Eindeckeln in Mowiol erfolgte ebenfalls wie in 3.9.2 *Immunfluoreszenz an Zellen* beschrieben.

3.9.5 Für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper

Antigen	Spezies	pk/mk	Hersteller	Verdünnung	Fixierung Zellen
Erstantikörper					
Aquaporin-2	Kaninchen	pk	US Biological	1:200	4 % PFA
α -Tubulin	Maus	mc	Sigma	1:500	Methanol
β -Catenin	Kaninchen	pk	Sigma	1:100	4 % PFA
Centrin 1/2	Kaninchen	pk	Biolegend	1:300	Methanol
E-Cadherin	Maus	mk	BD	1:100	4 % PFA
Galectin-3	Kaninchen	pk	Prof. H.P. Elsässer	1:400	4 % PFA
Galectin-3	Maus	mk	Santa Cruz	1:200	4 % PFA
gp114	Kaninchen	pk	Prof. A. Le Bivic	1:300	
Villin	Kaninchen	pk	S. Rubunic	1:500	4 % PFA
Zweitantikörper					
Maus-IgG (Alexa488)	Ziege	pk	Invitrogen	1:500	
Maus-IgG (Alexa546)	Ziege	pk	Invitrogen	1:500	
Maus-IgG (Alexa647)	Ziege	pk	Invitrogen	1:500	
Kaninchen-IgG (Alexa488)	Ziege	pk	Invitrogen	1:500	
Kaninchen-IgG (Alexa546)	Ziege	pk	Invitrogen	1:500	
Kaninchen-IgG (Alexa647)	Ziege	pk	Invitrogen	1:500	

3.10 Fluoreszenzmikroskopische Anwendungen

3.10.1 Lebendzellbeobachtung

Zur Untersuchung des pH-Wertes in intrazellulären Kompartimenten wurde eine Lebendzellbeobachtung (*live cell imaging*) durchgeführt. Die Lebendzellbeobachtung wurde mit einem Leica DMI6000B Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt. Dieses wurde mit dem Heizeinsatz der Klimakammer ca. eine Stunde vor dem Start des Versuches eingeschaltet und auf 37°C vorgeheizt, um mögliche Fokusverschiebungen während des Versuches zu vermeiden. Für den Versuch wurden voll auspolarisierte

MDCK_{p75GFP} Zellen auf Filtern in 24 Lochschalen verwendet. Nach Kopplung des pH sensitiven Farbstoffs pHrodo an Galectin-3 (siehe 3.6.2 *Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten Proteinen*) wurde dieses für 30 min bei 4°C auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Filter mit PBS++ gewaschen, ausgeschnitten und kopfüber in eine mit PBS++ gefüllte Bachofer Kammer gegeben. Anschließend wurde die Endozytose des Lectins in der Klimakammer des Mikroskops initiiert und alle 2,5 min eine Stapelaufnahme in xz-Ebene durchgeführt. Nach 30 min wurden 20 mM oder 50 mM NH₄Cl bzw. 60 µg/mL Chloroquin zugegeben und die Aufnahmen fortgesetzt.

Verwendeter Filterwürfel

Filterwürfel	Excitationsfilter [nm]	Dichromatischer Spiegel [nm]	Emissionsfilter [nm]	Fluorophor
Ds Red	552 ± 6	570	605 ± 33	pHrodo

3.10.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Ein Vorteil der konfokalen Mikroskopie gegenüber der Epifluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass nur emittiertes Licht aus der Fokusebene detektiert wird und Licht von außerhalb der Fokusebene angeregten Fluoreszenzmolekülen ausgeblendet wird. Dies wird durch zwei Lochblenden im Strahlengang garantiert. Eine davon befindet sich zwischen anregendem Laser und Objekt und fokussiert den Laserstrahl punktförmig auf das Präparat. Eine weitere Lochblende befindet sich zwischen dem Objekt und dem Detektor und blendet Licht, das nicht aus der Fokusebene kommt aus. Sind Anregungs- und Detektionsfokus gleich, spricht man von konfokaler Mikroskopie. Durch diese optische Anordnung wird nie das gesamte Präparat beleuchtet, sondern immer nur ein kleiner Bildpunkt. Das Präparat wird somit abgerastert (*Scanning* Mikroskopie).

In dieser Arbeit wurde das konfokale Laserscanning Mikroskop Leica TCS SP2 mit einem HCX PL Apo 63x/1,2 W CORR Objektiv und einem HCX PL Apo CS 40x/oil Objektiv verwendet. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Bildpunkten aufgenommen und jede Bildzeile wurde mindestens achtfach

gescannt. Zur Verhinderung des *cross talks* zwischen den Kanälen d.h. die Anregung eines Fluorophors mit der Emissionswellenlänge eines anderen Fluorophors, wurden die Aufnahmen im sequentiellen Modus angefertigt. Dabei wurden die Fluorophore einzeln nacheinander durch ihre Laserlinie angeregt und die Emission separat detektiert. Die Erstellung von Intensitätsprofilen wurde mittels der Leica-Software LSM-Light durchgeführt, Stapelaufnahmen wurden mit Hilfe des Programms Volocity (Improvision) einer Dekonvolution und 3D Rekonstruktion unterzogen.

Es wurden folgende Einstellungen für die einzelnen Fluorophore verwendet:

Fluorophor	Laserlinie zur Anregung [nm]	Detektion der Emission [nm]
GFP, Alexa 488	488	494 - 544
Alexa 546	543	549 - 646
Alexa 647	633	640 - 700
YFP	514	518 - 540
Hoechst 33342	405	416 - 475

3.10.3 GSDIM (ground state depletion microscopy followed by individual molecule return)

Das GSDIM Verfahren ist eine hochauflösende Mikroskopietechnik, bei der Auflösungen von bis zu 50 nm erzielt werden können. Das Prinzip der GSD Mikroskopie beruht auf der Detektion von einzelnen voneinander separierten emittierenden Fluorophoren. Dabei werden die Fluorophore in einen Dunkelzustand versetzt und können anschließend einzeln lokalisiert werden. In der Fluoreszenzmikroskopie werden delokalisierte π -Elektronen im Fluoreszenzfarbstoff von einem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 überführt (Abb. 3.6). Fallen diese Elektronen zurück in den S_0 Zustand wird Fluoreszenzlicht emittiert. Bei der GSD Mikroskopie wird ein Großteil der Elektronen mit Hilfe eines Lasers in den Dunkelzustand (D) versetzt. Im Gegensatz zu den Elektronen im ON-Zustand sind diese im OFF-Zustand befindlichen nicht mehr zur Emission von Licht in der Lage. Einzelne Elektronen kehren nun spontan aus dem Dunkelzustand zurück in den Grundzustand S_0 .

Während andere Elektronen nun in den OFF-Zustand überführt werden, fluoreszieren diese in den S_0 Zustand zurückgebrachten Elektronen für einen kurzen Zeitraum. Dadurch beobachtet man ein Aufleuchten oder Blinken im Präparat. Die genaue Lokalisation der Fluorophore wird über einen Algorithmus bestimmt. Zum Schluss entsteht ein hochauflösendes GSDIM Bild, das aus vielen entstandenen Einzelbildern errechnet wurde.

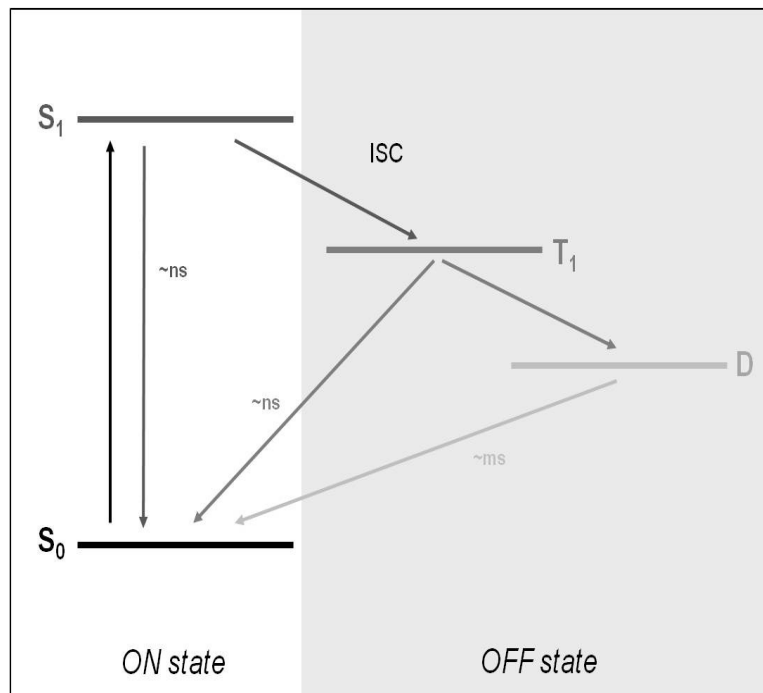


Abb. 3.6 Jablonski-Diagramm zur Darstellung der GSDIM-Methode

Delokalisierte π -Elektronen können zwischen einem Grundzustand S_0 und einem angeregten Zustand S_1 zirkulieren (beides ON- Zustände). Dabei kommt es zur Emission von Fluoreszenzlicht. Werden die Elektronen in den Triplett-Zustand T_1 oder sogar in den Dunkelzustand D versetzt sind sie nicht mehr in der Lage Licht zu emittieren. Dieser OFF-Zustand ist langlebig und nur durch eine Spinumkehr (*intersystem crossing*, ISC) möglich. Anschließend kehren einzelne Moleküle in den anregbaren Grundzustand zurück und fluoreszieren.

In dieser Arbeit wurden Zellen auf Deckgläsern kultiviert verwendet und wie in 3.9.3 Immunfluoreszenzfärbung für GSDIM beschrieben vorbereitet. Als Einbettmedium mit reduzierenden Bedingungen wurde 100 mM β -

Mercaptoethylamin (MEA) in PBS verwendet und 100 μ L davon in die Vertiefung eines *Depression Slide* gegeben. Anschließend wurde das Deckgläschen über der Vertiefung positioniert und überschüssiges MEA mit einem Tuch entfernt. Zum luftdichten Verschließen wurden gleiche Teile Twinsil® gemischt und anschließend der Rand des Deckgläschens damit versiegelt. Für die hochauflösenden Aufnahmen wurde ein Leica SR GSD (DMI 6000B TIRF) Mikroskop mit einem 100x Öl-Objektiv verwendet. Die verwendeten Fluorophore wurden mit Hochleistungslasern von 488 nm und 642 nm in den Dunkelzustand versetzt. Zusätzlich wurde ein 405 nm Laser verwendet, der die Fluorophore aus dem Dunkelzustand schneller in den S_0 Zustand zurückholt. Für die Bildbearbeitung wurde die LAS AF GSD Software verwendet.

3.11 Transmissionselektronenmikroskopische Methoden

Das Auflösungsvermögen eines Licht- oder Fluoreszenzmikroskops ist durch die Wellenlänge der eingesetzten Lichtstrahlen begrenzt. Da Elektronen im Vergleich eine sehr viel kleinere Wellenlänge besitzen können, kann ein viel höheres Auflösungsvermögen erzielt werden. Mit der Elektronenmikroskopie können somit theoretisch Auflösungen von etwa 0,1 nm erreicht werden im Vergleich zur Lichtmikroskopie, deren Auflösung ca. 200 nm beträgt. In jedem Elektronenmikroskop herrscht ein Vakuum, damit die Elektronen nicht durch Gasmoleküle abgelenkt werden. Dies ist u.a. der Grund für eine spezielle präparative Aufbereitung der Proben.

3.11.1 Probenpräparation

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben aus der normalen Niere und aus dem Tumorbereich entnommen. Die Proben wurden in 1 mm³ große Stücke geschnitten und anschließend für 2 h bei 4°C in ITO fixiert. Nach 3x 10 min Waschen in Cacodylatpuffer wurden die Proben für 1 h bei 4°C in Osmiumtetroxid + Kaliumhexacyano-ferrat 1:1 inkubiert. Danach wurden sie in

dH₂O gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit 0,3 % Uranylacetat kontrastiert. Anschließend wurden sie erneut in Cacodylatpuffer gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Dann erfolgte die Einbettung in Epon812 über 48 - 72 h. Nach Aushärten der Proben wurden Ultradünnschnitte (60-100 nm) angefertigt, auf Metallnetze (*Grids*) aus Kupfer gezogen und für 5 min mit Bleicitrat nachkontrastiert. Zuletzt wurden die Proben in dH₂O gewaschen und mit einem TEM 109 (Zeiss, Oberkochen) untersucht.

Cacodylatpuffer

0,1 M Cacodylsäure-Natriumsalz
pH 7,4

ITO

2,5 % (w/v) Paraformaldehyd
2,5 % (w/v) Glutaraldehyd
0,05 % (v/v) Pikrinsäure
Mit 0,1 M Cacodylatpuffer auf 50 mL auffüllen

Osmiumtetroxid

1 % (w/v) OsO₄
1,5 % (w/v) Kaliumhexacyanoferrat
1:1 mischen

Uranylacetat

0,3 % (w/v) Uranylacetat in 50 mL Maleatpuffer pH 5

Epon

Lösung A: 62 mL Epikote 812 (Glycidether), 100 mL Dodecenylbernsteinsäure-anhydrid (DDSA)

Lösung B: 100 mL Epikote 812, 89 mL Methylnadicanhydrid

1:1 mischen

0,2 mL/10 mL 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol

3.12 Statistik

Zur Gewährleistung der statistischen Relevanz wurden immer mindestens drei Wiederholungen des jeweiligen Versuches durchgeführt. Die Darstellung statistischer Daten sowie deren Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SD oder Mittelwerte \pm SEM. Zum Vergleich von zwei Gruppen miteinander wurde die statistische Signifikanz je nach Versuchskonzeption mit Hilfe eines gepaarten oder ungepaarten t-Tests bestimmt. Aufgrund der Alphafehlerinflation wurde beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen miteinander eine einfaktorielle oder zweifaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) in Kombination mit einem Post-Hoc-Test nach Bonferroni oder Tukey verwendet.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in drei Teilbereiche. Im ersten Teilbereich (4.1) werden Ergebnisse zur Lokalisation und Expression von Galectin-3 und verschiedenen apikalen und basolateralen Markerproteinen im klarzelligen Nierenzellkarzinom vorgestellt sowie Untersuchungen zu Galectin-3-Interaktionspartnern in diesem Gewebe. Der zweite Teilbereich (4.2) beinhaltet Ergebnisse, die sich auf die Untersuchung des Recyclings und der näheren Charakterisierung der Endozytose von Galectin-3 in Epithelzellen beziehen. Der letzte Teilabschnitt (4.3) widmet sich der Untersuchung des Einflusses des pH Wertes auf die Ligandenbindung und Komplexbildung von Galectin-3.

4.1 Galectin-3 und das klarzellige Nierenzellkarzinom

Galectin-3, ein galactosebindendes Lectin, fungiert durch seine Beteiligung an vielen zellulären Prozessen als vielversprechender Biomarker bei der Ausprägung verschiedenster Tumore in der Niere und Blase (Waalkes *et al.*, 2010). Die Untersuchung der zellulären Lokalisation und des Expressionsverhaltens sowie die Identifikation von Interaktionspartnern von Galectin-3 in humanen Nierenzellkarzinomen sollen bei der Aufklärung der Beteiligung des Lectins an der Entstehung von Nierenzellkarzinomen helfen. Für diese Untersuchungen wurden insgesamt jeweils drei Gewebeproben aus unterschiedlichen Bereichen der Niere von insgesamt 101 Patienten mit Nierenzellkarzinom entnommen. Bei den Bereichen handelte es sich um gesundes Nierengewebe, Übergangsgewebe (Bereich zwischen normalem und Tumorgewebe) und Tumorgewebe.

4.1.1 Klassifikation der Patientenproben

Nach Entnahme der Niere wurden die Gewebeproben eingehend makroskopisch und mikroskopisch untersucht und mit Hilfe von PD Dr. Hegele (Universitäts Klinikum Marburg) nach UICC (*Union for internationale Cancer Control*) pTNM-Klassifikation (*TNM Classification of Malignant Tumors*) klassifiziert (Abb. 4.1 und Tabelle 4.1; Klassifikation siehe 2.5.2 *Klassifikation der Nierenzellkarzinome*).

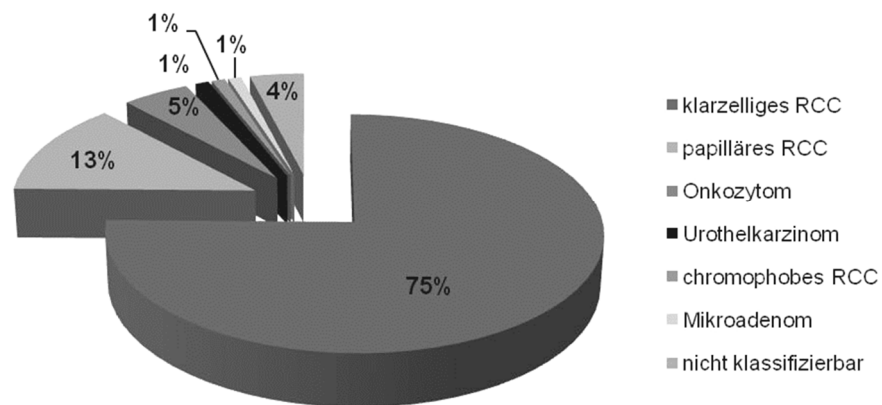


Abb. 4.1 Graphische Darstellung der Häufigkeit (in %) der Tumorarten von 101 untersuchten Patienten mit Nierenzellkarzinomen

Von den untersuchten Patienten wiesen 75 % ein klarzelliges Nierenzellkarzinom, 13 % ein papilläres Nierenzellkarzinom, 5 % ein Onkozytom, jeweils 1 % ein Urothelkarzinom, ein chromophobes Nierenzellkarzinom und Mikroadenom auf. Die verbleibenden 4 % konnten nicht klassifiziert werden. Alle weiteren Untersuchungen erfolgten ausschließlich mit Proben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms und den dazugehörigen gesunden Nierengewebeproben. Nach weiteren histologischen Untersuchungen konnten weitere dieser Gewebeproben der klarzelligen Nierenzellkarzinome ausgeschlossen werden, da diese nicht den gewünschten Gewebebereich enthielten oder z.B. zu viel Bindegewebe mit entnommen wurde. Die Gesamtzahl der Patienten, deren Gewebeproben in die Auswertung mit einbezogen wurden reduzierte sich daher letzten Endes auf 68.

Tabelle 4.1 Histopathologische Klassifizierung und Besonderheiten

Grading		G1	G2	G3	G4
Patient [n]		4	57	7	0

Staging	T1a	T1b	T2a	T2b	T3a	T3b	T3c	T4
Patient [n]	9	20	11	1	14	10	1	2

Alter [Jahre]	>60	<60	Geschlecht	weiblich	männlich	Metastasen	M1	M0
Patient [n]	48	20	Patient [n]	35	33	Patient [n]	18	40

4.1.2 Histologie des Nierengewebes und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Zur besseren Untersuchung der Morphologie der einzelnen Gewebeproben wurden HE- und Azan-Färbungen an histologischen Schnitten durchgeführt (siehe 3.8.4 *Hämatoxilin-Eosin Färbung* und 3.8.5 *Azan-Färbung*). Abb. 4.2 zeigt repräsentative Gewebeschnitte aus der gesunden Niere, dem Übergangsbereich und dem eigentlichen Tumorgewebe. Der renale Kortex des gesunden Nierengewebes zeichnet sich durch eine Vielzahl an Glomeruli aus und weist eine unveränderte Tubulstruktur auf (Abb. 4.2 A, D). Die Epithelzellen des proximalen Tubulus sind durch apikale Mikrovilli charakterisiert, die das sternförmige Lumen dieser Tubuli auskleiden. Im Vergleich dazu besitzen die etwas flacheren Epithelzellen des distalen Tubulus keinen Bürstensaum und zeichnen sich durch eine schärfer abgegrenzte apikale Oberfläche und einen kleineren Durchmesser des Lumens aus. Das Sammelrohr besitzt einen ähnlichen Durchmesser wie der proximale Tubulus, ist aber wie der distale Tubulus durch das Fehlen eines Bürstensaums gekennzeichnet.

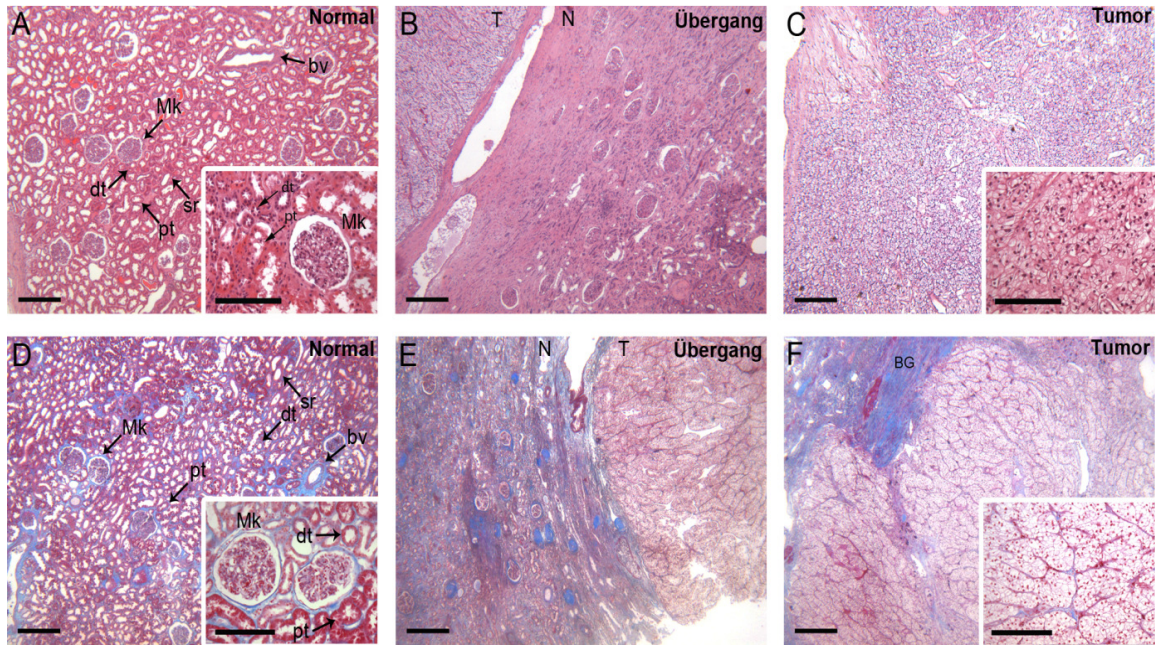


Abb. 4.2 Repräsentative HE- und Azan-Färbungen von humanem Nierengewebe

(A, D) Renaler Kortex aus gesundem Nierengewebe. (B, E) Übergangsgewebe. (C, F) Tumorgewebe aus dem klarzelligen Nierenzellkarzinom. Alle Präparate wurden HE- (A-C) und Azan-gefärbt (D-F). Mk: Malpighisches Körperchen, dt: Distaler Tubulus, pt: Proximaler Tubulus, sr: Sammelrohr, bv: Blutvene, N: Normalgewebe, T: Tumorgewebe, BG: Bindegewebe. Maßstab: 300 µm, Maßstab Vergrößerungen: 150 µm.

Im Übergangsgewebe lässt sich erkennen, dass die Zerstörung dieser gut organisierten tubulären Struktur bereits beginnt (Abb. 4.2 B, E). Im Tumorgewebe selbst ist kein klar definierter Tubulus mehr zu erkennen (Abb. 4.2 C, F). Das klarzellige Nierenzellkarzinom zeichnet sich durch ein kompaktes Wachstumsmuster, bestehend aus großen Zellen mit einem prominenten Anteil an aufgehelltem, fokal leicht eosinophilen Zytoplasma aus. Die Zellkerne sind teilweise leicht vergrößert und besitzen eine pleomorphe Gestalt. Manche Zellen sind sogar polynukleär. Die Verteilung des Bindegewebes verändert sich mit zunehmender Tumorentstehung (Abb. 4.2 D-F). Während im gesunden Nierengewebe das Bindegewebe zwischen den Tubuli eingebettet ist, wird der Tumor regelrecht von einer Bindegewebskapsel eingeschlossen.

4.1.3 Ultrastruktur der Niere und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen des gesunden Nierengewebes und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms sollten subzelluläre Unterschiede genauer beleuchtet werden. Die Epithelzellen des proximalen Tubulus sind durch gut ausgebildete dicht gepackte Mikrovilli, die das Lumen des Tubulus auskleiden, charakterisiert (Abb. 4.3 A). Zwischen den Mikrovilli zeigt sich ein ausgeprägter Endozytoseapparat bestehend aus tubulären Invaginationen (Iv), die in das apikale Zytoplasma ragen sowie sich abschnürende Vakuolen (V). Die Zellen besitzen einen großen zentralen Nukleus. Die Zellorganellen wie der Golgi-Apparat (GA), Lysosomen (L) und eine Vielzahl großer Mitochondrien (gekennzeichnet durch Pfeile) sind ebenfalls gut zu erkennen (Abb. 4.3. A). Die Epithelzellen des distalen Tubulus sind kleiner als die des proximalen und besitzen keinen Bürstensaum. Lediglich vereinzelte kleine Mikrovilli sind an der apikalen Oberfläche zu sehen (Abb. 4.3 B). Der Zellkern ist relativ rund und oft in Richtung apikaler Zelloberfläche lokalisiert. Die Zellen zeichnen sich ebenfalls durch eine Vielzahl an großen länglichen Mitochondrien aus (Abb. 4.3 B; Pfeile). An der basolateralen Seite der Zellen konnte ein tubuläres Netzwerk mit Verbindung zu benachbarten Zellen, das intrazelluläre Labyrinth (IL), beobachtet werden (Abb. 4.3 B).

Im Vergleich zu normalem Nierengewebe sind die Zellgrenzen der Tumorzellen schwer erkennbar (Abb. 4.3 C, D, E, F). Manchmal sind die Zellen durch einen schmalen Spalt voneinander getrennt. Sie zeichnen sich durch ein ergiebiges Zytoplasma mit wenig erkennbaren Zellorganellen und einem relativ zentralen Nukleus mit im Vergleich zum normalen Nierengewebe irregulärer Form aus. In einigen Zellen konnten zwei Zellkerne beobachtet werden. Oft sind kleine Gruppen von runden Mitochondrien mit gut ausgeprägten lamellenartigen Cristae und dichter Matrix zu beobachten (Abb. 4.3 C, E; Pfeile). Die Gesamtzahl der Mitochondrien ist allerdings im Vergleich zum gesunden Nierengewebe geringer. Auffällig ist ebenfalls der hohe Glykogengehalt der Zellen (Abb. 4.3 D, F; Sternchen) und die Einlagerung von vielen Lipidtröpfchen (Li) (Abb. 4.3 C, D, F), die dem Zytoplasma sein klarzelliges Aussehen

verleihen. Auf der Oberfläche befinden sich sehr kleine mikrovilli-artige Strukturen (Abb. 4.3 E; Pfeilköpfe).

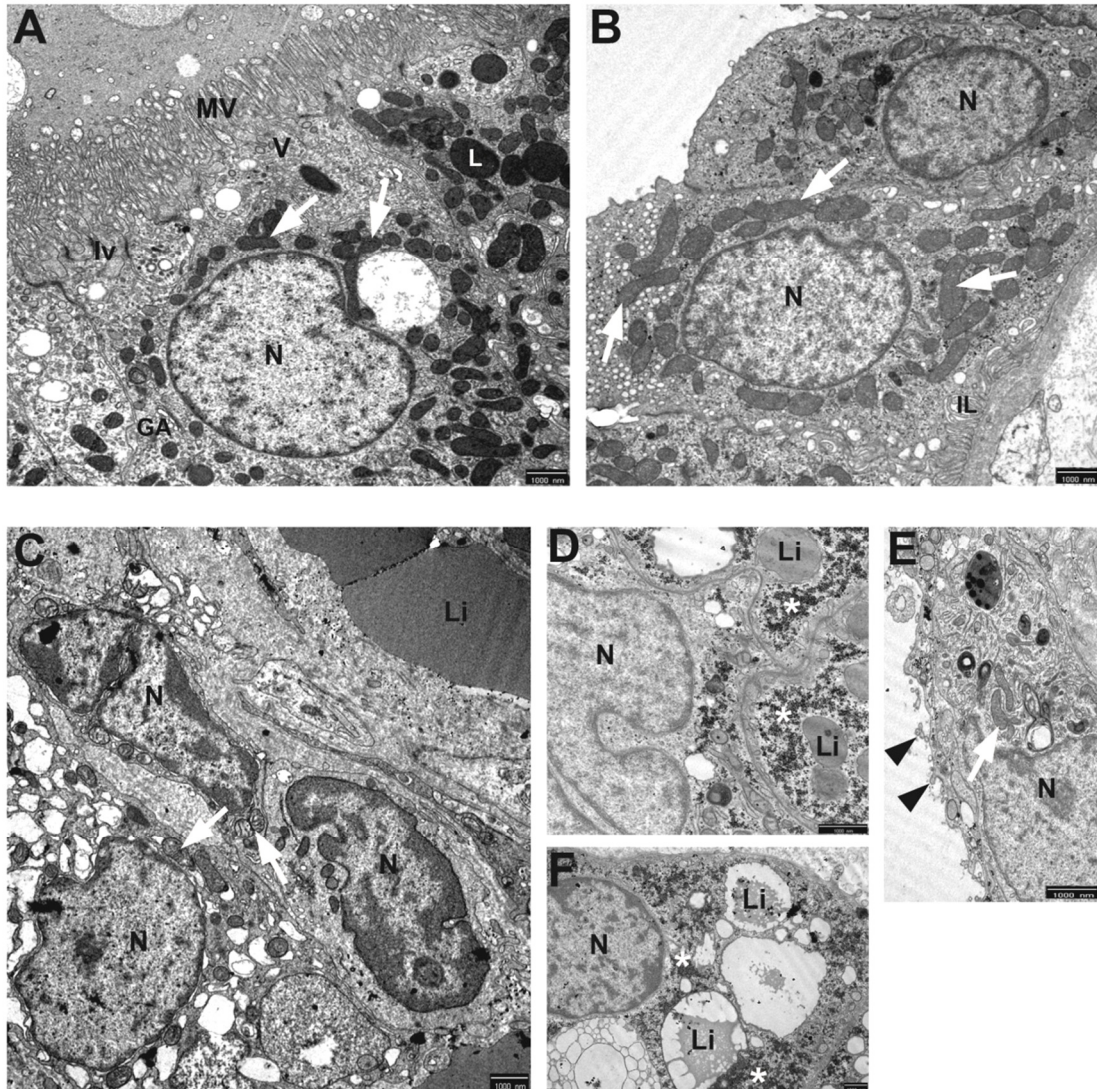


Abb. 4.3 Ultrastruktur der Niere und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Epithelzellen des proximalen Tubulus (**A**) des distalen Tubulus (**B**) und Aufnahmen aus dem klarzelligen Nierenzellkarzinom (**C - F**). Die Pfeile markieren Ansammlungen von Mitochondrien. Bereiche mit hohem Glykogengehalt sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die schwarzen Pfeilköpfe markieren kleine mikrovilliartige Ausstülpungen an der Oberfläche von klarzelligen Nierenzellkarzinom Zellen. N, Nuklei; MV, Mikrovilli; L, Lysosomen; Li, Lipidtröpfchen; IL, Intrazelluläres Labyrinth; GA, Golgiapparat; V, Vakuolen; Iv, Invaginationen. Maßstab: 1µm.

4.1.4 Renale Zellen des distalen Tubulus und Sammelrohres exprimieren Galectin-3

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von Galectin-3 wurden Gewebeproben aus gesundem Nierengewebe und aus dem klarzelligen Nierenzellkarzinom von 68 Patienten immunhistologisch im Vergleich mit endogenen Polaritätsmarkern mittels KLSM untersucht. Abb. 4.4 zeigt repräsentative Beispiele. Als apikale Markerproteine wurde die Lokalisation von Aquaporin-2 und Villin sowie E-Cadherin und β -Catenin als basolaterale Marker untersucht. Aquaporin-2 ist deutlich in apikalen Vesikeln der Hauptzellen des Sammelrohres lokalisiert (Takata *et al.*, 2008) (Abb. 4.4 A). Im Vergleich dazu ist Villin im gesunden Nierengewebe ausschließlich in den Mikrovilli der Tubulilumen auskleidenden Epithelzellen des proximalen Tubulus zu lokalisieren (Robine *et al.*, 1985) (Abb. 4.4 C). Die basolateralen Markerproteine E-Cadherin und β -Catenin zeigen eine deutliche basolaterale Lokalisation im distalen Tubulus und im Sammelrohr der gesunden Niere (Abb. 4.4 E, G). Galectin-3 ist lediglich in vereinzelten Epithelzellen des distalen Tubulus und des Sammelrohres zu detektieren (Abb. 4.4 A, C, E, G). In Galectin-3 positiven Zellen des Sammelrohres konnte meistens kein Aquaporin-2 lokalisiert werden, was auf Hauptzellen hindeutet. Da sich die Galectin-3 Verteilung auf einzelne Zellen erstreckt, führt es zu einem mosaikartigen Expressionsmuster. Das Lectin ist hauptsächlich im Zytosol der Zellen lokalisiert. Die Zellen des Tumorgewebes sind im Vergleich zu den Epithelzellen des gesunden Nierengewebes stark dedifferenziert und haben ihre charakteristische polare Struktur verloren (Abb. 4.4 B, D, F, H). Die apikalen Markerproteine Aquaporin-2 und Villin sowie die basolateralen Markerproteine E-Cadherin und β -Catenin sind im Tumorgewebe nicht mehr zu lokalisieren. Dahingegen kann Galectin-3 verstärkt im Zytosol und auch in den Nuklei der Tumorzellen detektiert werden (Abb. 4.4 B, D, F, H).

Anhand der Untersuchungen zur Lokalisation von Galectin-3 und den apikalen sowie basolateralen Polaritätsmarkern mittels KLSM, konnte eine Reduktion der Markerproteine und eine Zunahme der Galectin-3- Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom beobachtet werden.

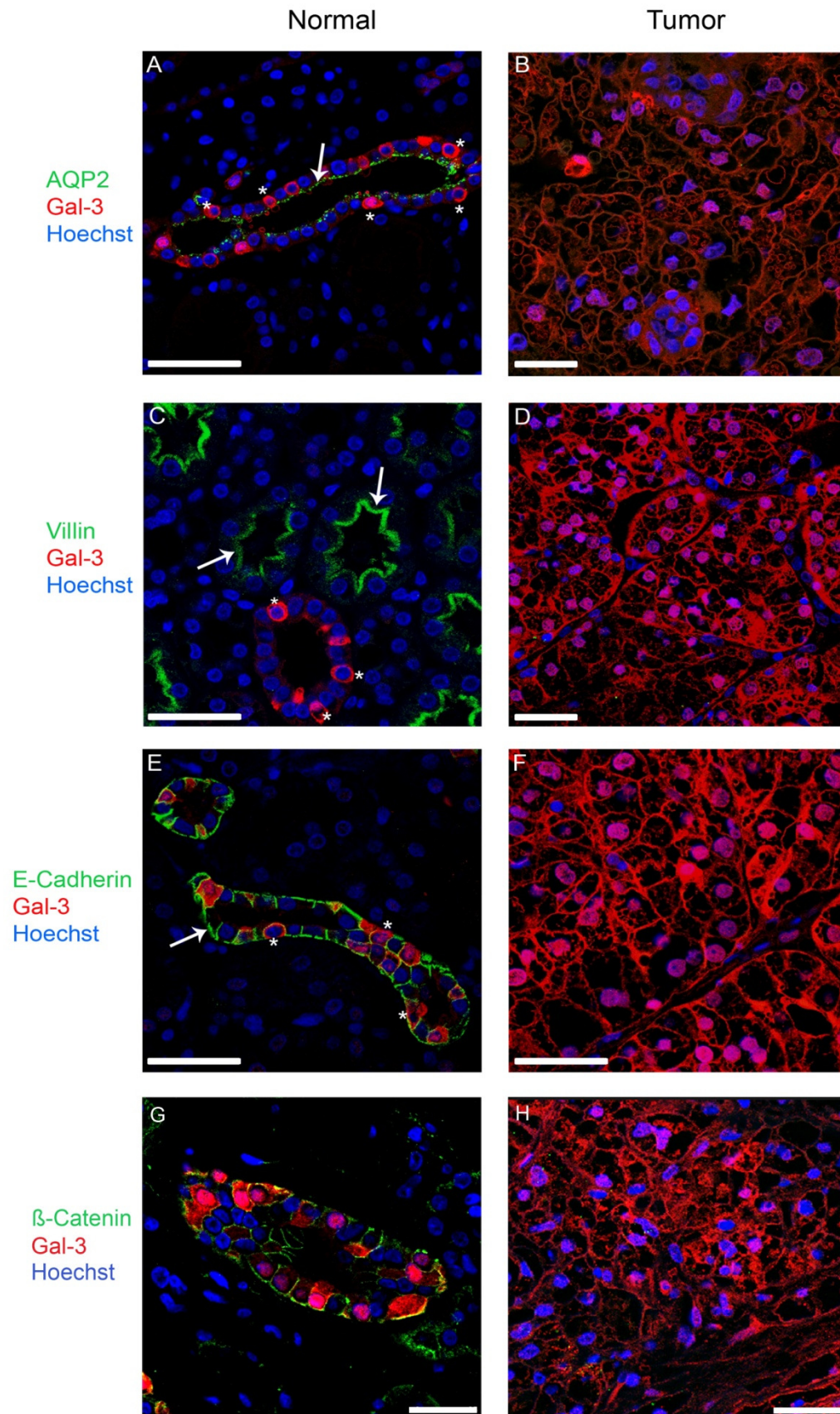


Abb. 4.4 Lokalisation von Galectin-3 und apikalen sowie basolateralen Polaritätsmarkern im gesunden Nierengewebe und in klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen Galectin-3 (Alexa546, rot), die apikalen Marker Aquaporin-2 und Villin (Alexa488, grün) sowie die basolateralen Marker E-Cadherin und β -Catenin (Alexa488, grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. **(A)** Aquaporin-2 ist unter der apikalen Membran von Epithelzellen des Sammelrohres zu finden. **(C)** Villin ist im Bürstensaum des proximalen Tubulus lokalisiert. **(E, G)** E-Cadherin und β -Catenin kleiden die basolaterale Domäne von Epithelzellen des distalen Tubulus und des Sammelrohres aus. Pfeile kennzeichnen die apikale bzw. basolaterale Lokalisation der Polaritätsmarker. Galectin-3 weist ein mosaikartiges Expressionsmuster auf und befindet sich nur im distalen Tubulus und im Sammelrohr (A, C, E, G). Sterne kennzeichnen einzelne Galectin-3 positive Zellen. **(B, D, F, H)** Im Tumorgewebe sind keine Polarisationsmarker mehr zu detektieren, wohingegen Galectin-3 in jeder Tumorzelle exprimiert wird. Maßstab: 25 μ m.

4.1.5 Erhöhte Expression von Galectin-3 im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Bisher bekannte Ergebnisse zum Expressionsverhalten von Galectin-3 in Nierenzellkarzinomen liefern ein sehr heterogenes Bild (Young *et al.*, 2001). Zur Untersuchung des Expressionsverhaltens von Galectin-3 wurden Gewebeproben aus dem gesunden Nierengewebe, Übergangsgewebe und Tumorgewebe von 39 Patienten untersucht. Die Proben wurden homogenisiert und gleiche Proteinmengen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Immunoblot-Analyse von Galectin-3, E-Cadherin, Villin, β -Catenin, GAPDH und α -Tubulin. Ein Großteil der Patienten ($\geq 79\%$) zeigt einen Anstieg von Galectin-3 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe, während die Expression von E-Cadherin und Villin im Tumorgewebe sinkt (Abb. 4.5). Im Übergangsgewebe schwankte das Expressionsverhalten von Galectin-3 und beiden Polaritätsmarkern zwischen den Messwerten des Normalgewebes und denen des Tumorgewebes. Aufgrund dieser Heterogenität wurde das Übergangsgewebe aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Abb. 4.5 B und C zeigen das Verhältnis von Galectin-3, Villin und E-Cadherin im normalen Gewebe und Tumorgewebe sowie die relative Veränderung des Proteins in den einzelnen Patienten. Die Messwerte wurden dabei auf die Summe der Messwerte aus Normal- und Tumorgewebe normalisiert.

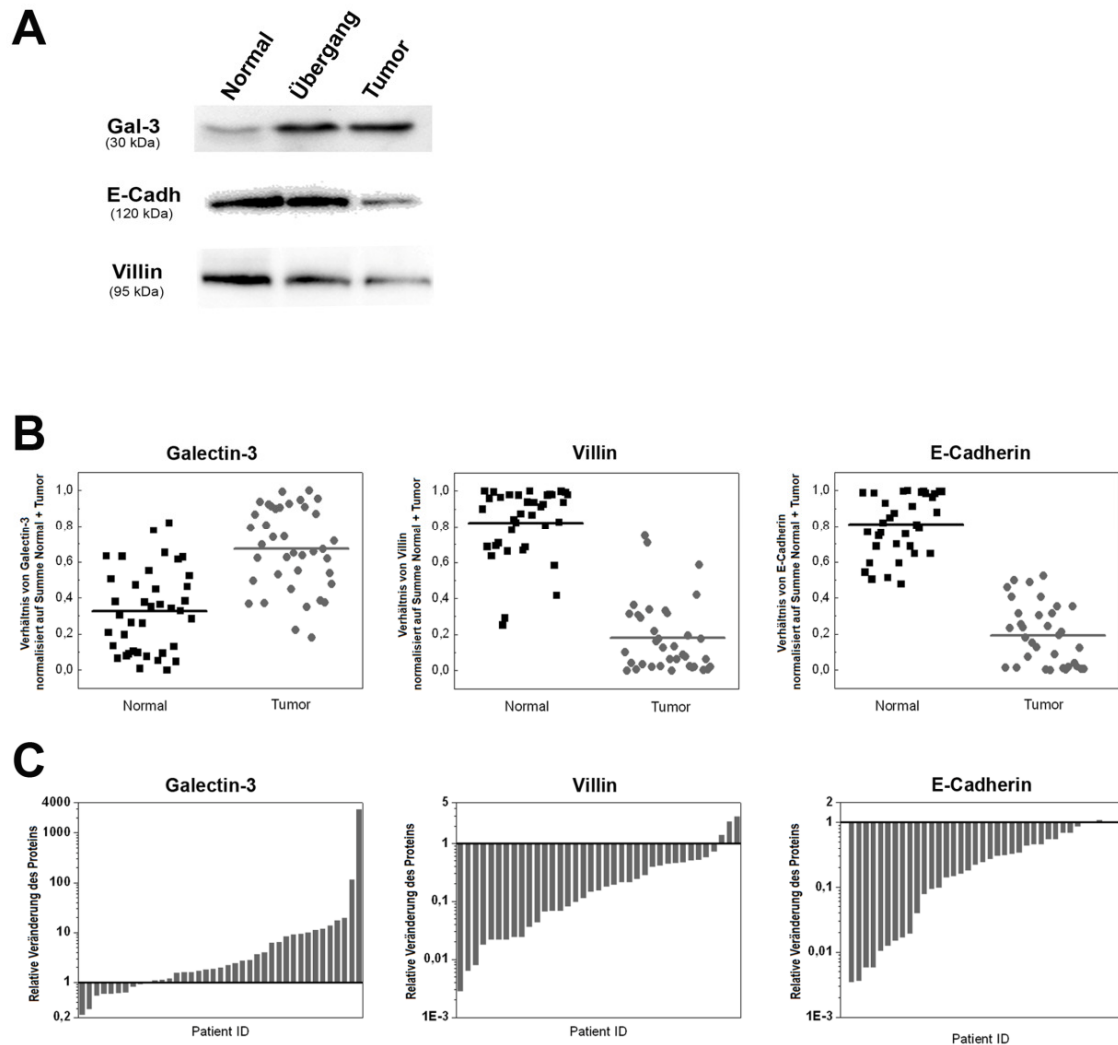


Abb. 4.5 Expressionsverhalten von Galectin-3, Villin und E-Cadherin in klarzelligem Nierenzellkarzinom im Vergleich zu normalem Nierengewebe

Gleiche Proteinmengen aus Gewebelysaten von 39 Patienten wurden mittels SDS-PAGE und Immunblot Analyse auf die Expression von Galectin-3, E-Cadherin und Villin untersucht. **(A)** zeigt ein repräsentatives Beispiel eines Western Blots. Nach Quantifizierung aller Immunblots wurde das Verhältnis des jeweiligen Proteins im Normalgewebe mit dem Tumorgewebe verglichen **(B)** und die relative Veränderung der Proteinexpression in den einzelnen Patienten dargestellt **(C)**. Die Messwerte wurden auf die Summe der Werte von Normal und Tumor normalisiert. Galectin-3 ist im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Nierengewebe stark erhöht, während die Expression von E-Cadherin und Villin im Großteil der Patienten abnimmt. Eine statistische Auswertung erfolgte mit einem Student's t-test (** $p < 0,001$).

Für die densitometrische Quantifizierung wurden außerdem α -Tubulin und GAPDH als Referenzproteine im Vergleich zu β -Catenin getestet. Abb. 4.6 A zeigt das Verhältnis der Proteine im Normal- und Tumorgewebe normalisiert auf die Summe aus Normal und Tumor. Die Expression von β -Catenin sinkt im Tumor im Vergleich zum gesunden Gewebe. Die Expression von GAPDH steigt im Tumorgewebe an. Für die Expression von α -Tubulin ist keine ansteigende oder abfallende Tendenz zu beobachten. Daraufhin wurden alle Expressionsmesswerte von Galectin-3, Villin und E-Cadherin auch auf α -Tubulin normalisiert (Abb. 4.6 B). Beide Berechnungen zeigen im Großteil der Tumorgewebeproben einen eindeutigen Anstieg der Expression von Galectin-3 bei gleichzeitiger Reduktion der Expression von Villin und E-Cadherin (Abb. 4.5 B und 4.6 B). Insgesamt zeigten 79 % der Patienten mit ccRCC einen klaren Anstieg der Galectin-3 Expression während der Tumorentwicklung (Abb. 4.5. C).

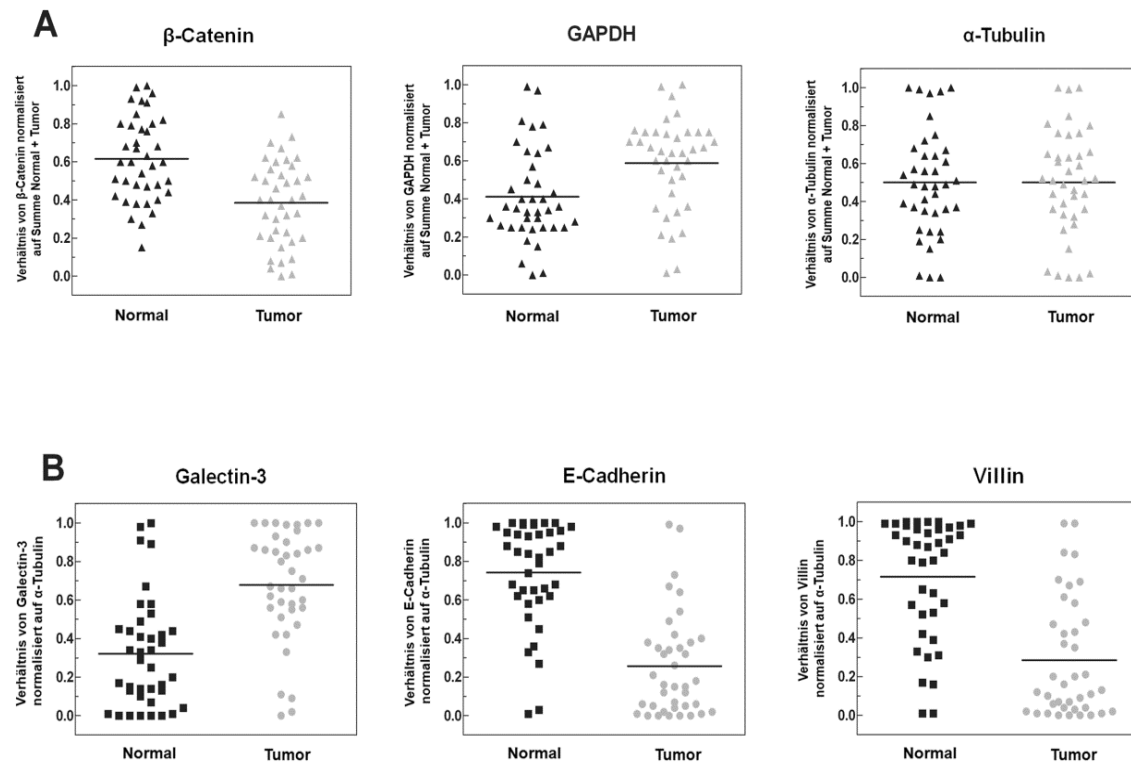


Abb. 4.6 Expressionsverhalten von β -Catenin, GAPDH und α -Tubulin in klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Der Proteingehalt von β -Catenin, GAPDH und α -Tubulin wurde in Gewebelysaten von 39 Patienten mittels SDS-PAGE und anschließend Immunoblot analysiert (**A**). α -Tubulin blieb im Vergleich zu GAPDH und β -Catenin im Normalgewebe und Tumorgewebe konstant und eignete sich somit als Referenzprotein. Das Verhältnis von Galectin-3, E-Cadherin und Villin im Tumor verglichen mit dem Normalgewebe wurde daraufhin noch einmal ermittelt und auf α -Tubulin normalisiert (**B**). Galectin-3 ist in der Mehrheit der Patienten im Tumorgewebe stark erhöht. Gleichzeitig sinkt die Expression von Villin und E-Cadherin im Tumorgewebe.

Tabelle 4.2 zeigt die klinikopathologischen Parameter, einschließlich Alter, Geschlecht histologisches *Grading* und Metastasierung der untersuchten Patienten in Abhängigkeit der Galectin-3 Expression. Die Patienten wurden dazu in zwei Gruppen mit hoher bzw. niedriger Galectin-3 Expressionsrate eingeteilt. Auffällig dabei ist, dass keiner der Patienten mit einem erniedrigten Lectingehalt im Tumor bis zum Zeitpunkt der Nephrektomie Metastasen ausgebildet hat.

Tabelle 4.2 Klinikopathologische Charakteristika der untersuchten Patientenpopulation

Parameter	Hohe Galectin-3 Expression Anzahl Patienten (%)	Niedrige Galectin-3 Expression Anzahl Patienten (%)
Alter		
< 60	4 (12,9)	3 (37,5)
> 60	27 (87,1)	5 (62,5)
Geschlecht		
Männlich	14 (45,2)	3 (37,5)
weiblich	17 (54,8)	5 (62,5)
Clinical Stage		
I	12 (38,7)	4 (50,0)
II	6 (19,4)	0
III	11 (35,5)	4 (50,0)
IV	2 (6,4)	0
Histological Grade		
G1	2 (6,4)	0
G2	22 (71,0)	7 (87,5)
G3	7 (22,6)	1 (12,5)
Metastasen		
M0	20 (64,5)	8 (100)
M1	11 (35,5)	0
n	31 (100)	8 (100)

4.1.6 Untersuchung der Lokalisation und Expression von Galectin-3 und apikalen sowie basolateralen Markerproteinen in RC-124 und RCC-FG1 Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von Galectin-3 auf die Entstehung von klarzelligen Nierenzellkarzinomen wurde neben Gewebeproben aus Patienten auch ein Zellkulturmodell mit einbezogen. Dabei handelte es sich um die humane Nierenzelllinie RC-124 und die aus humaner Niere gewonnene Klarzell-Karzinom Zelllinie RCC-FG1 (siehe 3.4.1 *Verwendete Zelllinien*). Das Wachstum beider Zelllinien wurde mittels Lichtmikroskopie beobachtet. Die RC-124 Zelllinie bildet ein einschichtiges Epithel aus und wächst nach Erreichen der Konfluenz, nach etwa fünf bis sechs Tagen nicht übereinander. Die Zellen besitzen eine längliche Form mit einem zentralen, relativ runden Nukleus, der

einen Großteil der Zelle ausfüllt (Abb. 4.7, RC-124). Die RCC-FG1 Zellen wachsen im Vergleich schneller und erreichen nach etwa vier bis fünf Tagen Konfluenz. Auch sie wachsen aufgrund von Kontaktinhibition nicht übereinander. Sie bilden eine irreguläre Zellform aus mit einem großen Zytoplasmaanteil (Abb. 4.7, RCC-FG1). Beide Zelllinien wurden auf Deckgläschen kultiviert und über sieben Tage beobachtet. An Tag 1, 3 und 7 wurden Zellen jeweils fixiert und immunhistologisch auf die Verteilung von Galectin-3, dem apikalen Markerprotein Villin und dem basolateralen Markerprotein E-Cadherin untersucht (Abb.4.7).

Galectin-3 befindet sich sowohl in RC-124 Zellen und in RCC-FG1 Zellen vermehrt im Zytoplasma. Im Laufe der Zelldifferenzierung verringert sich das Galectin-3-Signal bei RC-124 Zellen minimal während es bei RCC-FG1 Zellen an Signalstärke zunimmt. Die Verteilung in RC-124 Zellen ist eher gleichmäßig während sie in RCC-FG1 Zellen eine netzartige Struktur aufweist, die sich bereits an Tag 1 erkennen lässt und sich dann während der Differenzierung verdichtet. Galectin-3 ist bei diesen Zellen bis in die Zellfortsätze zu lokalisieren. Die Verteilung von E-Cadherin beschränkt sich bei RCC-FG1 Zellen auf vesikuläre Strukturen im subnukleären Bereich während in RC-124 Zellen das gesamte Zytoplasma mit vesikulären Strukturen, positiv für E-Cadherin, ausgefüllt ist. Bei beiden Zellarten nimmt die Signalstärke mit zunehmender Zelldifferenzierung ab.

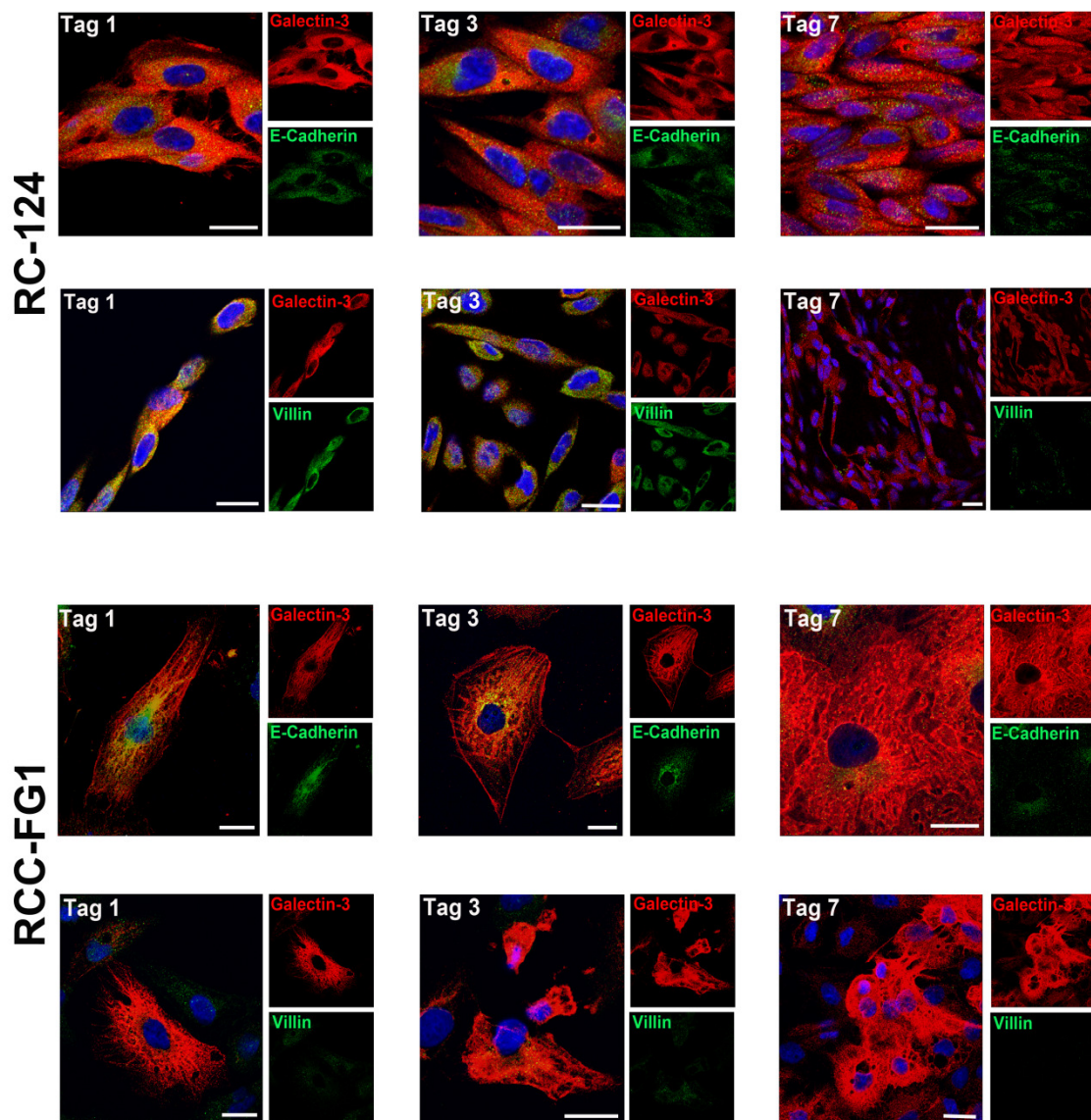


Abb. 4.7 Lokalisation von Galectin-3, E-Cadherin und Villin während der Zelldifferenzierung von RC-124 und RCC-FG1

Immunhistologische Färbung von Galectin-3-Alexa546 (rot), Villin-Alexa488 (grün) bzw. E-Cadherin-Alexa-488 (grün) in RC-124 und RCC-FG1 Zellen an Tag 1, 3 und 7 nach Ausplattieren. Galectin-3 ist im Zytoplasma lokalisiert und wird über die gesamten 7 Tage exprimiert, während E-Cadherin und Villin lediglich in vesikulären Strukturen im Zytoplasma auftreten und sich mit zunehmender Zelldifferenzierung verringern. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Maßstab: 20 µm

Villin ist bei beiden Zelllinien ebenfalls in vesikulären Strukturen im Zytoplasma zu lokalisieren und nimmt während der Zelldifferenzierung wie E-Cadherin ab.

An Tag 1 und 3 lassen sich sogar Kolokalisationen von Villin mit Galectin-3 in RC-124 Zellen und von E-Cadherin mit Galectin-3 in RCC-FG1 Zellen beobachten.

Zur Unterstützung der aus Patientengewebe gewonnen Ergebnissen wurde auch das Expressionsmuster von Galectin-3 im Zellkulturmodell untersucht. Die Zellen wurden 6 Tage kultiviert, lysiert und gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Expression von Galectin-3 und E-Cadherin sowie GAPDH als Kontrollprotein, wurde mittels Immunoblot analysiert. Die Expression von Galectin-3 steigt in der Tumorzelllinie im Vergleich zu den normalen Zellen stark an, während die E-Cadherin-Expression in diesen Zellen sinkt (Abb. 4.8 A, B). Dies unterstützt die Beobachtungen der Patienten-Proben, so dass zusammenfassend gesagt werden kann, dass die Expression von Galectin-3 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen erhöht ist.

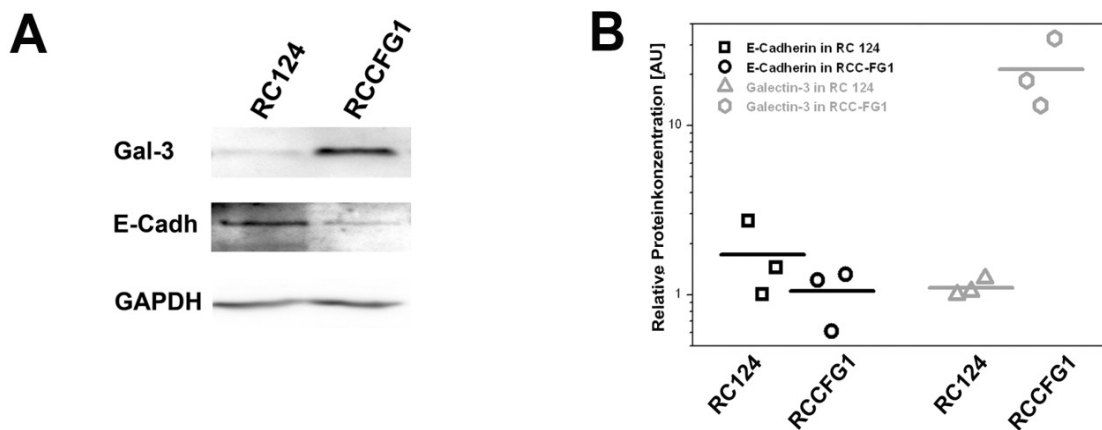


Abb. 4.8 Expressionsverhalten von Galectin-3 und E-Cadherin in RC-124 und RCC-FG1 Zellen

Zellen der humanen Nierenzelllinie RC-124 und der klarzelligen Nierenzellkarzinom Zelllinie RCC-FG1 wurden nach sechs Tagen Kultivierung lysiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblotanalyse auf die Expression von Galectin-3 und E-Cadherin sowie GAPDH, als Referenzprotein, untersucht. **(A)** Repräsentative Western Blots. **(B)** Quantifizierung anhand von drei unabhängigen Experimenten. Die Galectin-3 Expression ist in den RCC-FG1 Zellen im Vergleich zu den RC-124 Zellen stark erhöht, wohingegen die Expression von E-Cadherin in diesen Zellen sinkt.

4.1.7 Nukleäre Akkumulation von Galectin-3 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Die subzelluläre Lokalisation von Galectin-3 hängt vom Zelltyp und den experimentellen Konditionen ab, da es vermehrt im Zytoplasma (Gaudin *et al.*, 2000; Openo *et al.*, 2000) oder Nukleus (Gaudin *et al.*, 2000; Moutsatsos *et al.*, 1987) lokalisiert werden konnte. Je nach Lokalisation in der Zelle nimmt Galectin-3 einen unterschiedlichen Einfluss auf die zellulären Prozesse. Zur genaueren Untersuchung der zellulären Lokalisation von Galectin-3 wurden Gewebeschnitte aus normalen Bereichen und aus klarzelligen Nierenzellkarzinomen von neun Patienten immunhistologisch gefärbt und mittels KLSM untersucht. Zur Detektion des gesamten Fluoreszenzsignals in einer Zelle wurden z-Stapel aufgenommen und diese anschließend einer 3D-Rekonstruktion unterzogen. Abb. 4.9 A zeigt, dass Galectin-3 im Tumorgewebe zunehmend im nukleären Bereich konzentriert ist, während es im Normalgewebe hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. In Abb. 4.9 B ist die Fluoreszenzintensität von Galectin-3 (rot) und Hoechst (blau) in einem Querschnitt durch jeweils eine Zelle (weiße Linie in A) zu sehen. Die Intensitätsmaxima von Galectin-3 sind im Normalgewebe deutlich im zytoplasmatischen Bereich, wohingegen sie sich im Tumorgewebe zunehmend im Zellkern befinden.

Die Gewebeproben wurden weiterhin einer Zellkernisolation unterzogen (siehe 3.7.1 *Isolation von Zellkernen*) und mittels Western-Blot und anschließender Quantifizierung auf die subzelluläre Verteilung von Galectin-3 untersucht. Als Kontrollproteine zur Sicherstellung einer gelungenen Kernisolation wurden Antikörper gegen das in der Zellkernmembran lokalisierte Lamin und gegen die im Zytoplasma befindliche Lactatdehydrogenase (LDH) verwendet (Abb. 4.9 C). Repräsentative Immunoblots der zellulären Lokalisation von Galectin-3 sind in Abb. 4.9 D dargestellt. In sechs von neun Patienten konnte eine zunehmende Akkumulation des Lectins im Zellkern der Tumorzellen beobachtet werden (Abb. 4.9 D, E). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in klarzelligen Nierenzellkarzinomen die Expression von Galectin-3 erhöht ist und ein bedeutender Anteil davon in die Nuklei transportiert wird.

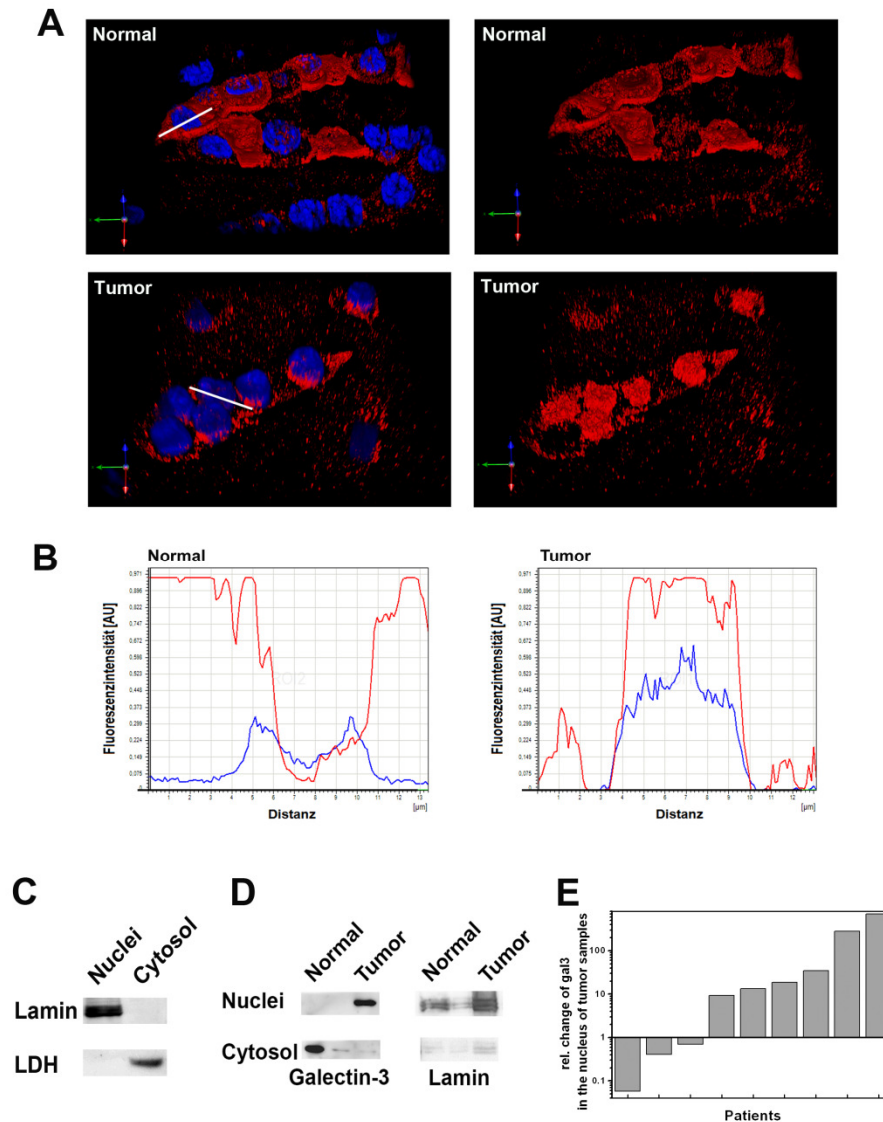


Abb. 4.9 Nukleäre Lokalisation von Galectin-3 in Normal- und Tumorgewebe

(A) Gewebeproben aus dem normalen Nierengewebe und aus dem klarzelligen Nierenzellkarzinom wurden immunhistologisch auf die zelluläre Lokalisation von Galectin-3 (rot) und Hoechst (blau) mit Hilfe des KLSM untersucht. Die aufgenommenen z-Stapel wurden dekonvoliert und anschließend eine 3D-Rekonstruktion erstellt. Auf der rechten Seite ist Galectin-3 ohne Kernfärbung dargestellt. Maßstab: 15 μm . (B) Intensitätsprofile des in A mit einer weißen Linie markierten Bereichs. (C) Repräsentative Immunoblots von nukleärem Lamin und zytosolischen LDH nach Zellkernisolation aus dem Normal- und Tumorgewebe. (D) Die Verteilung von Galectin-3 und Lamin in nukleären und zytosolischen Fraktionen zeigt, dass Galectin-3 sich in Zellen des Tumorgewebes vermehrt im Nukleus befindet, während es im Normalgewebe hauptsächlich im Zytosol lokalisiert ist. (E) Sechs von neun Patienten weisen diesen erhöhten Import des Lectins in den Zellkern auf.

4.1.8 Kolokalisation von Galectin-3 und Centrin-2 am Basalkörperchen des primären Ziliums

Eine polare Organisation von renalen Epithelzellen ist für die Funktionalität der Niere essentiell. Die vorherigen Untersuchungen an klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigen, dass die Entstehung von Tumorzellen mit dem Verlust der Zellpolarität einhergeht. Bei der Aufrechterhaltung der polaren Organisation von renalen Epithelzellen ist das primäre Zilium essentiell beteiligt, wie bereits in MDCK-Zellen gezeigt werden konnte (Bacallao *et al.*, 1989).

Eine Assoziation von Galectin-3 und Centrin-2 am Basalkörperchen des primären Ziliums von MDCK-Zellen konnte bereits gezeigt werden, sowie die gestörte Ziliogenese nach Depletion von endogenem Galectin-3 in MDCK Zellen und Mäusenieren (Koch *et al.*, 2010).

Für die hochauflösende Darstellung der Komponenten des Basalkörperchens wurden sechs Tage alte auf Deckgläschen kultivierte MDCK Zellen fixiert und mit einem Anti-Centrin-2 und Anti- α -Tubulin Antikörper immungefärbt und mittels GSDIM-Mikroskopie (Leica SR GSD) untersucht (Abb. 4.10 A). Im Vergleich dazu wurden Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop (Leica TCS SP2) von auf Deckgläschen kultivierten MDCK Zellen, die immunhistologisch gegen Centrin-2 und Galectin-3 gefärbt wurden, erstellt (Abb. 4.10 B). Mit dem GSDIM-Verfahren lassen sich das subapikale Mikrotubuli-Netzwerk und die halbkreis- bis ringförmigen Strukturen um den Basalkörper deutlich erkennen. Diese ringförmigen Strukturen sind zentral ausgerichtet, kommen einmal pro Zelle vor und sind positiv für Centrin-2 und α -Tubulin (Abb. 4.10 A, Pfeil). Im Vergleich dazu zeigen die KLSM-Bilder ebenfalls diese ringförmige Struktur, die positiv für Centrin-2 und Galectin-3 ist, in einer deutlich diffuseren Darstellung (Abb. 4.10 B, Pfeile). Die xz-Aufnahme zeigt, dass auch hier die halbmondförmigen Strukturen zentral über dem blau-gefärbten Zellkern liegen. Abschließend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der GSDIM-Technik die räumliche Anordnung von Komponenten des Basalkörperchens des primären Ziliums detailgetreu unterhalb der Beugungsgrenze dargestellt werden konnte.

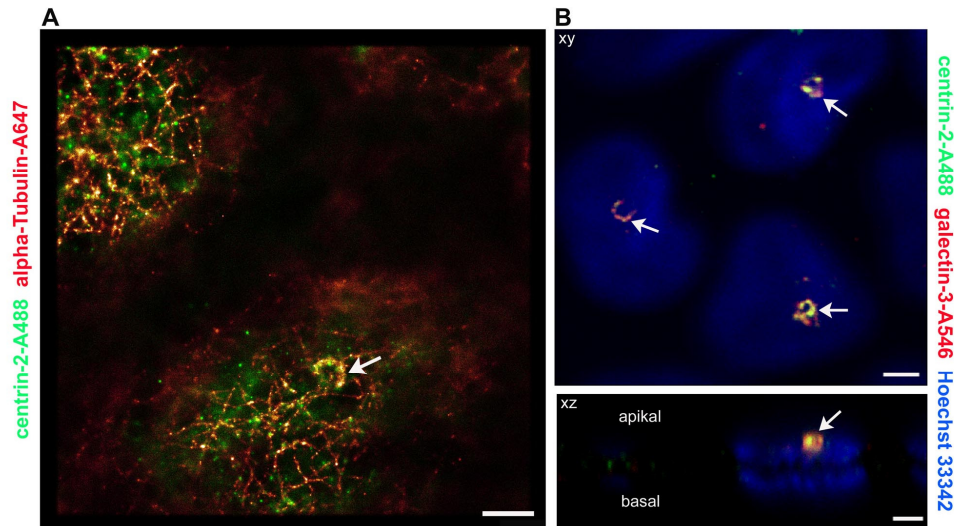


Abb. 4.10 Darstellung der Komponenten des Basalkörperchens mit Hilfe der GSDIM-Mikroskopie im Vergleich zur KLSM-Mikroskopie

(A) Auf Deckgläschen kultiviert MDCK Zellen wurden fixiert und mit Anti-Centrin-2-Alexa488 (grün) und Anti- α -Tubulin-Alexa647 (rot) immungefärbt und mit Hilfe des GSDIM-Mikroskops untersucht. Das subapikale Netzwerk aus Mikrotubuli und eine ringförmige Struktur, positiv für Centrin-2 und Tubulin (Pfeil) sind detailgetreu zu beobachten. Maßstab: 1 μ m

(B) MDCK Zellen, die mit Anti-Centrin-2-Alexa488 (grün) und Anti-Galectin-3-Alexa-647 (rot) immungefärbt wurden. Die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Die xy-Abbildung zeigt ringförmige Strukturen, die positiv für Centrin-2 und Galectin-3 sind (Pfeile). In der xz-Abbildung wird die zentrierte apikale Lokalisation dieser Struktur in der Zelle deutlich. Im Vergleich zum GSDIM-Bild zeigen die KLSM-Aufnahmen eine diffusere Darstellung der Proteine. Maßstab: 1 μ m

4.1.9 Das primäre Zilium bei der Entstehung klarzelliger Nierenzellkarzinome

Der Verlust des VHL-Gens beim von Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom und der damit einhergehende Verlust der Cilien sind auch an der Ausbildung von klarzelligen Nierenzellkarzinomen beteiligt (Gnarra *et al.*, 1994; Maher *et al.*, 1990). Desweiteren ist bekannt, dass auch Mutationen in Cilien-assoziierten Proteinen an der Ausprägung von u.a. Nierenzellkarzinomen verantwortlich sind (Sjoblom *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). Daher wurde die Lokalisation von

Centrin-2 und Galectin-3 sowie deren Expression während der Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms untersucht. Für diese Untersuchung wurden Gewebeschnitte von Methanol fixierten, Paraffin eingebetteten humanem Nierengewebe und klarzelligem Nierenzellkarzinom mit einem Anti-Galectin-3 und Anti Centrin-2 Antikörpern fluoreszenzmikroskopisch untersucht (siehe 3.9.1 *Immunfluoreszenzfärbung am Gewebe*). Abbildung 4.11 A zeigt einen distalen Tubulus und einen Ausschnitt eines Sammelrohres mit einer vermehrten apikalen Galectin-3 Lokalisation (rot) in einzelnen Zellen mit Kolokalisationen mit Centrin-2 (Pfeile). Im klarzelligen Nierenzellkarzinom ist keine tubuläre Struktur mehr zu erkennen. Galectin-3 ist diffus in der Zelle verteilt. Centrin-2 scheint deutlich geringer exprimiert, zusätzlich lässt sich die subzelluläre Lokalisation schwer definieren. Zudem treten sehr geringe Kolokalisationen mit Galectin-3 auf (Abb. 4.11 B, Pfeile).

Neben den Gewebeproben wurden RC-124 und RCC-FG1 Zellen Methanol fixiert und ebenfalls auf die Lokalisation von Galectin-3 und Centrin-2 mittels Immunfluoreszenzmarkierung untersucht (siehe 3.9.2 *Immunfluoreszenzfärbung an Zellen*). Galectin-3 befindet sich in den RC-124 Zellen vermehrt im Zytosol (Abb. 4.11 C, Vergrößerung unten rechts). Centrin-2 ist ausschließlich punktuell an der apikalen Oberfläche der Zelle zu beobachten, wo es mit Galectin-3 kolokalisiert (Abb. 4.11 C, Vergrößerung und E). Im Vergleich zu den RCC-FG1 Zellen weist jede RC-124 Zelle ein Basalkörperchen auf. In den RCC-FG1 Zellen wird Galectin-3 stark im Zytosol und Nukleus exprimiert (Abb. 4.11 D Vergrößerung und F), Centrin-2 hingegen ist nur vereinzelt zu beobachten.

Im Anschluss wurden je zehn unterschiedliche Bildausschnitte der RC-124 und RCC-FG1 Zellen auf Kolokalisationen von Centrin-2 mit Galectin-3 ausgezählt (Abb. 4.11 G). Während in den RC-124 Zellen ca. 45 % der Zellen eine Kolokalisation von Centrin-2 und Galectin-3 am Basalkörperchen aufweisen, zeigen nur ca. 20 % der RCC-FG1 Zellen diese Kolokalisation. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das primäre Zilium im klarzelligen Nierenzellkarzinom und RCC-FG1 Zellen nur noch vermindert ausgebildet wird

und die Kolokalisation von Centrin-2 und Galectin-3 aufgrund dessen verringert ist.

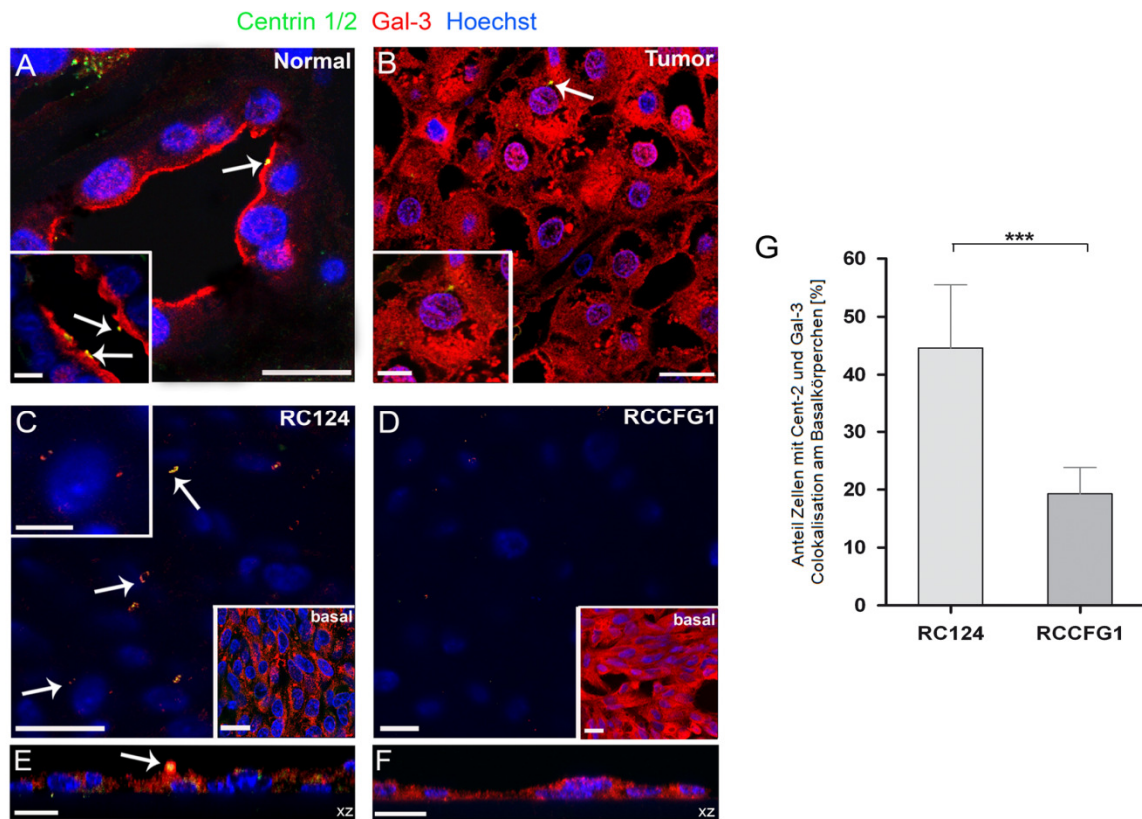


Abb. 4.11 Kolokalisation von Centrin-2 und Galectin-3 am Basalkörperchen des primären Zilioms in Nierenzellen

(A - D) Normales Nierengewebe (A) und klarzelliges Nierenzellkarzinomgewebe (B) sowie RC-124 (C) und RCC-FG-1 Zellen (D) wurden immunhistochemisch gegen Galectin-3 (rot) und Centrin-2 (grün) gefärbt und mittels KLSM auf Kolokalisationen (Pfeile) untersucht. An der apikalen Oberfläche der Epithelzellen des normalen Nierengewebes und den RC-124 Zellen sind die Basalkörperchen, positiv für Galectin-3 und Centrin-2. Im Tumorgewebe und in den RCC-FG1 Zellen sind nur noch vereinzelte ringartige Strukturen, positiv für Galectin-3 und Centrin-2 zu beobachten. Maßstab: 15 µm. (E - F) Mittels xz-Aufnahmen konnte die zentrale Lokalisation des Basalkörperchens in RC-124 (E) und RCC-FG1 Zellen (F) gezeigt werden. Maßstab: 15 µm (G) Die Anzahl der Kolokalisationen wurde anhand von zehn unterschiedlichen Bildausschnitten ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem t-Test (***) $p < 0,0001$

4.1.10 Erniedrigte Expression von CEACAM1 in RCC-FG1 Zellen und im klarzelligen Nierenzellkarzinom

CEACAM1 zählt zu den Zelladhäsionsmolekülen und wird in vielen verschiedenen Zellen exprimiert, darunter auch Epithel- und Endothelzellen der Niere (Hammarstrom, 1999; Prall *et al.*, 1996). Während der Tumorprogression in verschiedenen Organen wird die Expression von CEACAM1 verändert (Ergun *et al.*, 2000; Kammerer *et al.*, 2004; Neumaier *et al.*, 1993).

Somit stellte sich die Frage nach einer Korrelation zwischen der Expression von Galectin-3 und CEACAM1 während der Entstehung von Nierenzellkarzinomen. Für diese Untersuchung wurde zunächst die humane Zelllinie RC-124 und die Tumorzelllinie RCC-FG1 verwendet. Die Zellen wurden 6 Tage kultiviert, lysiert (siehe 3.5.1 *Herstellung von Zelllysaten*) und anschließend auf die Expression von Galectin-3 und CEACAM1 mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. Als Kontrollprotein wurde α -Tubulin verwendet und die relative Proteinkonzentration auf jenes normalisiert. Es zeigte sich eine signifikant erniedrigte Expression von CEACAM1 in den RCC-FG1 Zellen im Vergleich zu den RC-124 Zellen (Abb. 4.12 A, B). Die Expression von Galectin-3 dagegen ist in den RCC-FG1 Zellen im Vergleich zur Expression in den RC-124 Zellen um das sechs fache erhöht (Abb. 4.12 A, B).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde anschließend das Expressionsverhalten von Galectin-3 und CEACAM1 in gesundem Nierengewebe und Tumorgewebe analysiert (Abb. 4.12 C). Gewebeproben von 54 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom wurden untersucht. 11,1 % der Patienten wiesen eine erniedrigte Expression von CEACAM1 und Galectin-3 im Tumorgewebe auf (Abb. 4.12 C, linke Spalte). In 15,8 % der Patienten konnte eine Erhöhung der CEACAM1-Expression bei gleichzeitiger Erhöhung der Galectin-3-Expression beobachtet werden (Abb. 4.12 C, mittlere Spalte). Der Großteil der Patienten (70,4 %) zeigte allerdings eine Abnahme in der Expression von CEACAM1 bei gleichzeitigem Anstieg der Galectin-3 Expression im Tumorgewebe (Abb. 4.12 C, rechte Spalte). Eine signifikante Änderung des Kontrollproteins α -Tubulin wurde nicht beobachtet. In Abb. 4.12 D ist die relative Veränderung von CEACAM1 und Galectin-3 in jedem einzelnen Patienten dargestellt.

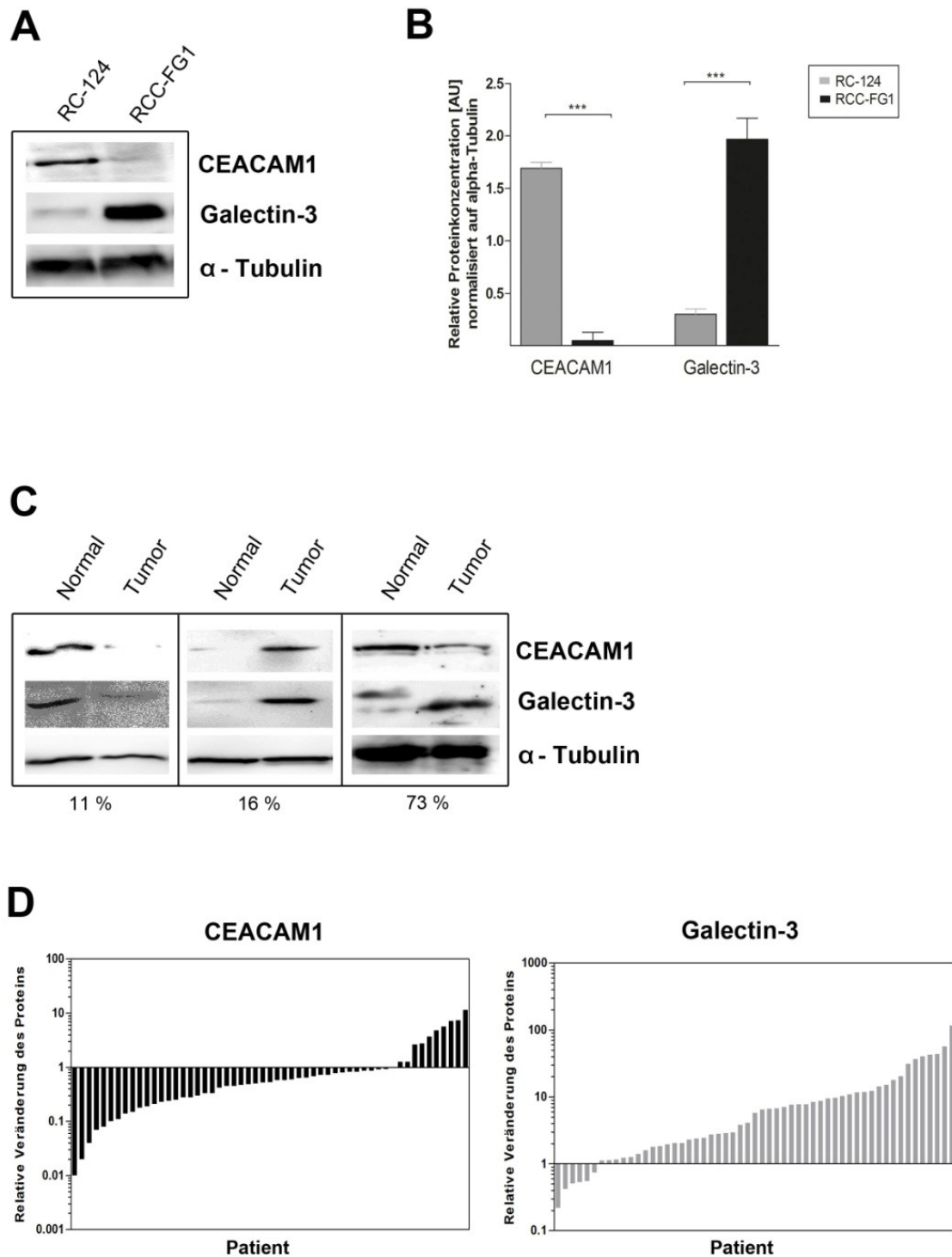


Abb. 4.12 Expressionsverhalten von Galectin-3 und CEACAM1 während der Tumorprogression (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 4.12 Expressionsverhalten von Galectin-3 und CEACAM1 während der Tumorprogression

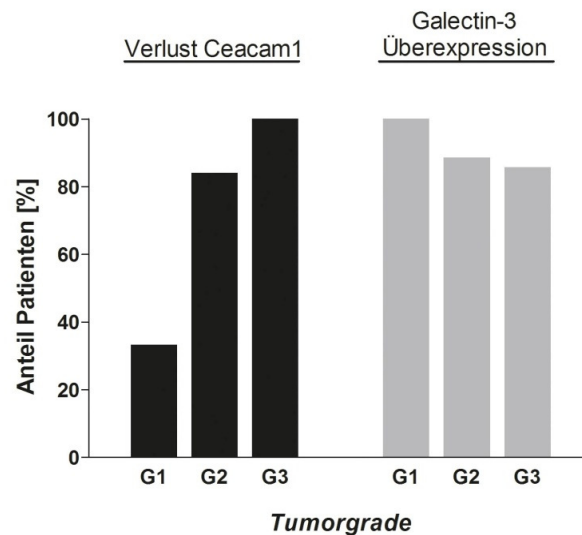
(A) Sechs Tage alte RC-124 und RCC-FG1 Zellen wurden auf die Expression von CEACAM1 und Galectin-3 untersucht. α -Tubulin wurde als Referenzprotein verwendet. (B) Quantifizierung von (A), dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der relativen Proteinkonzentration normalisiert auf α -Tubulin. Die statistische Analyse erfolgte anhand einer einfaktoriellen ANOVA gefolgt von einem Tukey-Post Test ($***p < 0,0001$). (C) Gesundes Nierengewebe und Gewebe aus klarzelligem Nierenzellkarzinomen wurde homogenisiert und im Western-Blot durch Verwendung eines anti-Galectin-3 und anti-CEACAM1 Antikörpers analysiert. Die Immunblots wiesen unterschiedliche Expressionsverhalten von CEACAM1 und Galectin-3 auf. Neben einem Expressionsanstieg beider Proteine, bei 11 % der Patienten, wurde auch ein Expressionsabfall beider Proteine, bei 16 % der Patienten, beobachtet. 73 % der Patienten zeigten eine Verringerung der CEACAM1 Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Gewebe bei gleichzeitigem Anstieg der Galectin-3 Expression im Tumor. (D) zeigt die relative Veränderung von CEACAM1 und Galectin-3 in 54 Patienten.

Die Patientendaten und das Zellkulturmodell zeigen, dass eine Reduktion der CEACAM1-Expression bei gleichzeitigem Anstieg der Galectin-3 Expression während der Tumorprogression stattfindet. Somit konnte die Vermutung einer Korrelation der Expression beider Proteine bestätigt werden.

4.1.11 Einfluss der Tumordifferenzierung auf die Expression von CEACAM1 und Galectin-3

Im Anschluss an die in 4.1.10 dargestellten Ergebnisse sollte nun die Tumordifferenzierung bei der Untersuchung der Expression von CEACAM1 und Galectin-3 berücksichtigt werden. Wie schon in Abb. 4.12, D gezeigt, wiesen 89% der untersuchten Patienten eine hohe Galectin-3-Expression und 11 % eine erniedrigte Galectin-3-Expression im Tumorgewebe auf. Von diesen Patienten zeigten 83 % eine Abnahme der CEACAM1-Expression und 17 % eine gesteigerte CEACAM1-Expression im Tumorgewebe. Ein gleichzeitiger Verlust der CEACAM1-Expression und ein Zunahme der Galectin-3-Expression im Tumorgewebe konnte bei 73 % der Patienten beobachtet werden (Abb. 4.12, C). Von den 54 untersuchten Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom konnten 6,5 % in die Tumordifferenzierungsstufe G1, 81,5 % in G2 und 13 % in

G3 eingestuft werden. Betrachtet man alle Patienten der Stufe G1 - G3 im Zuge ihrer Galectin-3-Überexpression lässt sich feststellen, dass 100 % der Patienten in Stufe G1 eine erhöhte Proteinexpression aufweisen. Diese erhöhte Galectin-3-Expression zeigt sich allerdings nur noch bei 89 % der Patienten in Stufe G2 und verringert sich nochmals auf 86 % in Stufe G3.



	n	Galectin-3 Expression		CEACAM1 Expression	
		niedrig	hoch	niedrig	hoch
	54 (100%)	6 (11,1%)	48 (88,9%)	45 (83,3%)	9 (16,7%)
G1	3 (5,5%)	0	3 (100%)	1 (33,3%)	2 (66,7%)
G2	44 (81,5%)	5 (11,4%)	39 (88,6%)	37 (84,1%)	7 (15,9%)
G3	7 (13%)	1 (14,3%)	6 (85,7%)	7 (100%)	0

Abb. 4.13 Die Expression von Galectin-3 und CEACAM1 unter dem Einfluss der Tumordifferenzierung

Die Patienten wurden je nach Galectin-3- und CEACAM1- Expression im Tumorgewebe in je zwei Gruppen eingeteilt. Daraufhin wurde der Einfluss der Tumordifferenzierung auf die erhöhte Expression von Galectin-3 und die verminderte Expression von CEACAM1 ermittelt.

Mit zunehmender Tumordifferenzierung nimmt die Überexpression von Galectin-3 leicht ab (Abb.4.13, rechts). Betrachtet man nun alle Patienten der Stufe G1 - G3 im Zuge ihres Expressionsverlustes von CEACAM1, lässt sich

feststellen, dass bei nur etwa 33 % der Patienten mit gering differenziertem Tumor (G1) eine Abnahme der CEACAM1-Expression zu beobachten ist. Allerdings zeigt sich diese Abnahme in 84 % der Patienten in Stufe G2; in Stufe G3 zeigen alle Patienten eine verminderte CEACAM1-Expression (Abb. 4.13, links). Folglich steigt mit zunehmender Tumordifferenzierung der Verlust an CEACAM1 Expression in den untersuchten Patienten.

4.1.12 CEACAM1 und Galectin-3 interagieren im Übergangsgewebe

Nachdem die Korrelation der Expression von CEACAM1 und Galectin-3 bestätigt werden konnte (siehe 4.1.10), sollte eine mögliche Interaktion der beiden Proteine während der Tumorentwicklung untersucht werden. Dazu wurden zunächst RC-124 und RCC-FG1 Zellen auf Deckgläschen kultiviert und nach sechs Tagen immunhistochemisch gefärbt (siehe 3.9.2 *Immunfluoreszenzfärbung an Zellen*) und anschließend mittels KLSM auf die Lokalisation von CEACAM1 (grün) und Galectin-3 (rot) untersucht. Während Galectin-3 ubiquitär im Zytoplasma der RC-124 und der RCC-FG1 Zellen verteilt ist, beschränkt sich die Lokalisation von CEACAM1 auf vesikuläre Strukturen. Einige dieser Vesikel sind ebenfalls für Galectin-3 positiv (Abb. 4.14 A, Pfeile markieren Bereiche mit Kolo-kalisationen).

Anschließend wurden Gewebeproben von fünf Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen auf die Lokalisation von CEACAM1 und Galectin-3 untersucht. Die Proben wurden Methanol fixiert und mit Antikörpern gegen das jeweilige Protein markiert (siehe 3.9.1 *Immunfluoreszenzfärbung am Gewebe*). CEACAM1 konnte im normalen Gewebe ausschließlich im proximalen Tubulus lokalisiert werden. Dort zeigte es eine zytoplasmatische Lokalisation und konnte verstärkt an der dem Tubuluslumen zugewandten apikalen Oberfläche der Zellen detektiert werden (Abb. 4.14 B). Kolo-kalisationen mit dem im proximalen Tubulus sehr schwach bis gar nicht exprimierten Galectin-3 konnten lediglich in vesikulären Strukturen im subapikalen Bereich einzelner Zellen des proximalen Tubulus beobachtet werden (Abb. 4.14 B links). Generell erscheint im Tumorgewebe die Fluoreszenzintensität von CEACAM1 im Gegensatz zu

Galectin-3 sehr schwach, was die Untersuchungen des Expressionsverhaltens beider Proteine in 4.1.11 bestätigt (Abb. 4.14 C, links). Einzelne Kolokalisationen konnten hier im Bereich der Zellmembran detektiert werden (Abb. 4.14 C, links, Pfeile). Am häufigsten konnten Kolokalisationen von CEACAM1 und Galectin-3 in Bereichen des sogenannten Übergangs beobachtet werden (Abb. 4.14 B, C, rechts, Pfeile). In diesen Bereichen ist die Tubulstruktur schon zum Teil defekt. Zwischen den Tubuli konnten Tumorzellen oder sich zu Tumorzellen entwickelnde Zellen, stark positiv für Galectin-3, beobachtet werden. Die Kolokalisation beider Proteine erstreckte sich in diesen Zellen auf den zytoplasmatischen Bereich.

Abb. 4.14 Galectin-3 und CEACAM1 im Übergangsgewebe

(A) RC-124 und RCC-FG1 Zellen, wurden auf die Lokalisation von Galectin-3 und CEACAM1 untersucht. CEACAM1 lokalisiert in vesikulären Strukturen, die teilweise auch positiv für Galectin-3 sind. Maßstab RC-124: 10 µm, RCC-FG1: 25 µm. **(B-C)** Gewebeproben aus normalen Nierengewebe, Tumorgewebe und Übergangsgewebe wurden auf die zelluläre Verteilung von CEACAM1 und Galectin-3 untersucht. **(B)** CEACAM1 ist stark an der apikalen Oberfläche von Epithelzellen des proximalen Tubulus lokalisiert und kolokalisiert mit Galectin-3 (Pfeile) in subapikalen vesikulären Strukturen dieser Zellen oder in tumordifferenzierenden Zellen. **(C)** Der geringe Anteil an CEACAM1 in den Tumorzellen kolokalisiert mit Galectin-3 auch hier in Bereichen des Übergangs hauptsächlich in der Zellmembran, aber auch im Zytosol. Maßstab: 25 µm. **(D)** Co-IP Studie mit RC-124 und RCC-FG1 Zelllysaten sowie Gewebelysaten der normalen Niere und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Die Co-präzipitation von CEACAM1 erfolgte mit Hilfe eines anti-Galectin-3 Antikörpers und anschließender Western Blotanalyse. Die Lysate stellen noch einmal das Expressionsverhalten der Proteine dar.

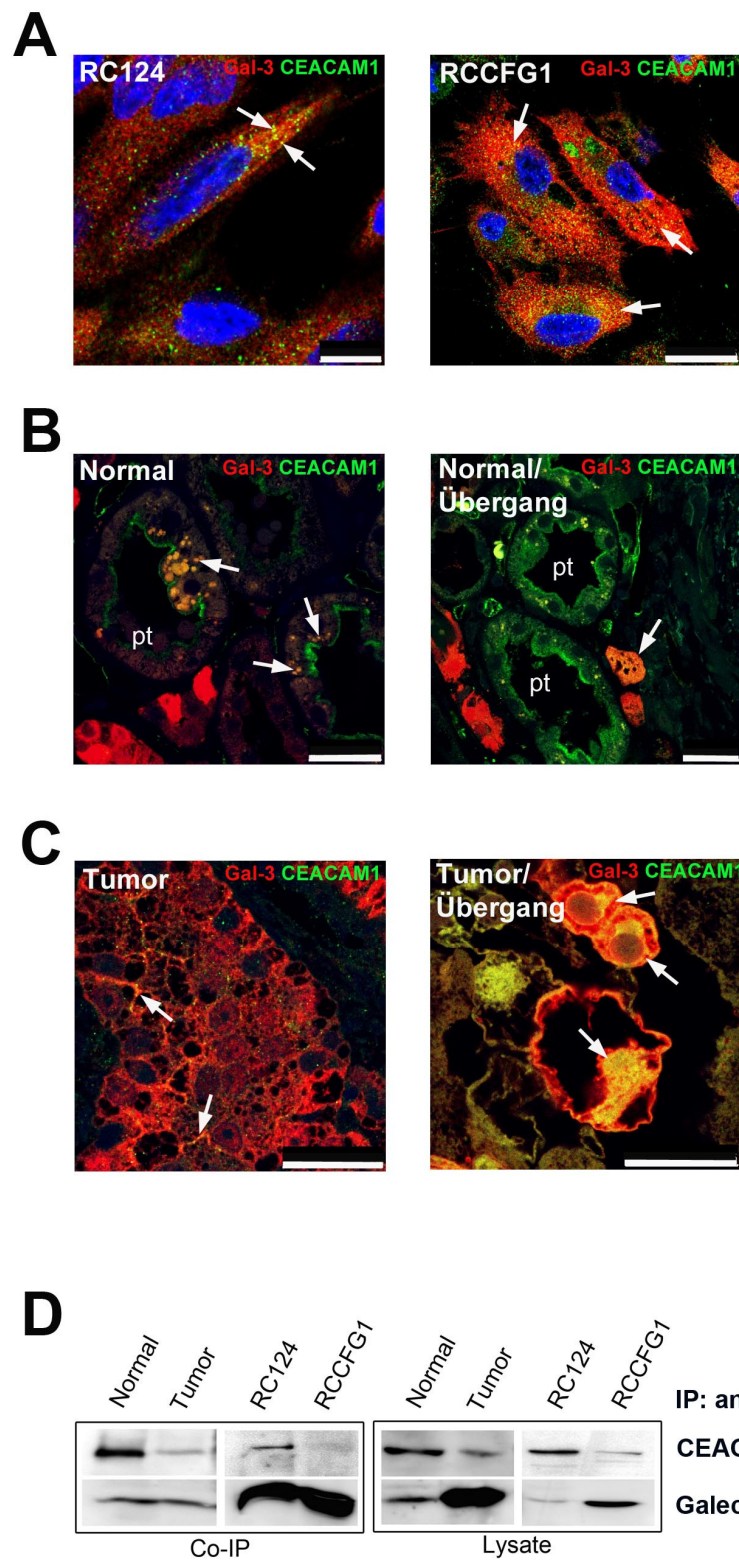


Abb. 4.14 Galectin-3 und CEACAM1 im Übergangsgewebe (Legende siehe vorherige Seite)

Die Kolokalisations-Beobachtungen deuteten auf eine mögliche Interaktion von CEACAM1 mit Galectin-3 hin und wurden anschließend mit Hilfe einer Co-Immunpräzipitation verifiziert. Dazu wurden Zelllysate aus je 6 10 cm Kulturschalen und 6 Tage alten RC-124 und RCC-FG1 Zellen sowie Gewebelysate aus der gesunden Niere und aus dem Tumor hergestellt. Diese wurden mit einem anti-Galectin-3 (169) Antikörper inkubiert und die entstandenen Proteinaggregate mittels PAS präzipitiert und mittels Western Blots analysiert (Abb. 4.14 D). Bei den Gewebelysaten handelte es sich um Proben aus drei der fünf Patienten, die zuvor fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden. Die Co-IP der Zelllysate wurde ebenfalls dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Anhand der Western Blots konnte eine eindeutige Präzipitation von Galectin-3 im Zell- und Gewebelysat festgestellt werden. CEACAM1 konnte verstärkt im Normalgewebe und in den RC-124 Zellen copräzipitiert werden, im Vergleich zu einer geringeren Copräzipitation in Tumor- bzw. den RCC-FG1 Zellen (Abb. 4.14 D, Co-IP). Dies spiegelt auch die verringerte Expression von CEACAM1 in den Tumorzellen wieder, wie die Signalintensität der Lysate zeigt (Abb. 4.14 D). Eine Interaktion von CEACAM1 und Galectin-3 konnte somit bestätigt werden. Die Patientendaten sollten allerdings durch weitere Co-IP Studien unterstützt werden. Zusätzlich sind die Patientenparameter zu berücksichtigen.

4.1.13 Identifikation von Galectin-3 Bindungspartnern

Galectin-3 ist in vielen zellulären Prozessen und an der Tumorentstehung involviert. Dabei spielen die zahlreichen Interaktionen mit anderen Proteinen eine große Rolle (Andre *et al.*, 1999; Nakahara *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Mit Hilfe einer Galectin-3 Affinitätssäule und anschließender ESI-MS/MS Untersuchungen sollten Bindungspartner von Galectin-3 identifiziert werden, die möglicherweise zur Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms beitragen. Für die Untersuchung wurden Zelllysate von RC-124 und RCC-FG1 Zellen hergestellt und über eine Galectin-3-Säule gegeben (siehe 3.6.4 *Isolierung von Galectin-3 Bindungspartnern aus RC-124 und RCC-FG1 Zellen*). Die

aufgefangenen Elutionsfraktionen wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm mit Hilfe der ÄCTA auf ihren Proteingehalt untersucht. (Abb. 4.15 A). Anschließend erfolgte eine Identifikation der Galectin-3 Bindungspartner mittels ESI-MS/MS durch Herrn Dr. Uwe Linne mit Unterstützung von Herrn Dr. Stefan Baumeister (Philipps-Universität Marburg). Aufgrund der zahlreichen Ergebnisse, sind hier nur bestimmte Protein aufgelistet, die eine Rolle in der Tumorprogression spielen könnten (Tabelle 4.3).

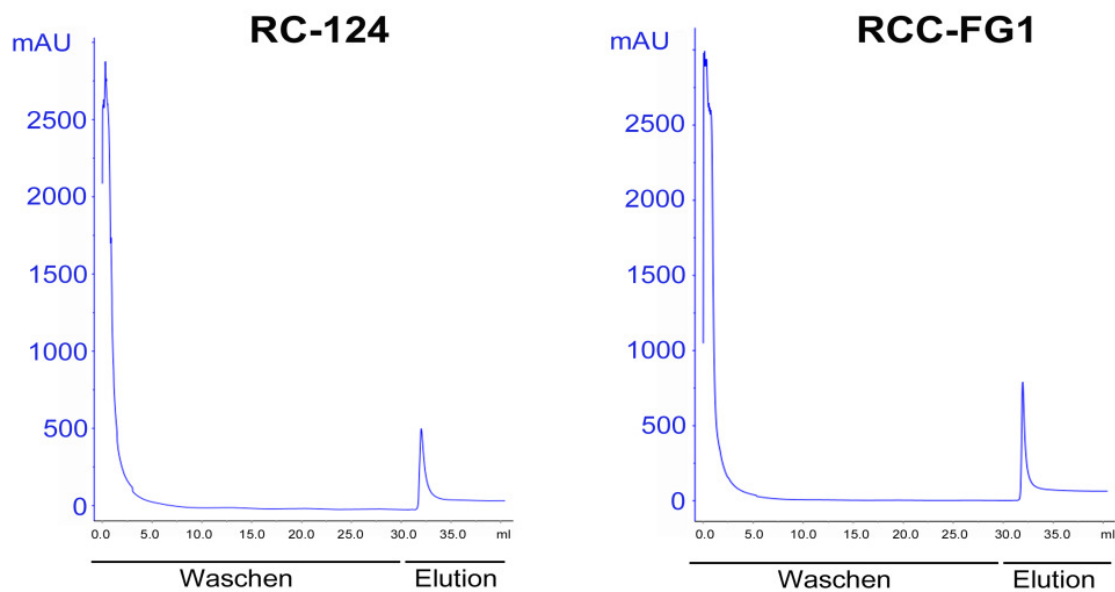


Abb. 4.15 Identifikation der proteinhaltigen Elutionsfraktionen

Tabelle 4.3 In RC-124 und RCC-FG1 identifizierte Galectin-3-Bindungspartner

RC-124

Accession-Nr.	Identität	Sequenz- übereinstimmung (%)
P27487	Dipeptidyl Peptidase 4	13
P43121	Zelloberflächenglykoprotein MUC18	11
P35222	β -Catenin-1	12
P14174	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)	29
Q5RDA4	Galectin-3-binding protein (MAC2BP)	23

RCC-FG1

Accession-Nr.	Identität	Sequenz- übereinstimmung (%)
P27487	Dipeptidyl Peptidase 4	13
P26233	β -Catenin	4
Q5RDA4	Galectin-3- <i>binding</i> protein (MAC2BP)	11
P43121	Zelloberflächenglykoprotein MUC18	11

4.2 Endozytose und Recycling von Galectin-3 an der apikalen Membran von Epithelzellen

Galectin-3 fungiert im apikalen Transport als Sortierplattform *raft unabhängiger* Proteine (Delacour *et al.*, 2006; Delacour *et al.*, 2008). Nach Erreichen der apikalen Zellmembran wird das Lectin in den Extrazellulärraum sekretiert, wo es weitere zahlreiche Funktionen ausführt. Vermutlich wird es erneut in die Zelle aufgenommen und in einem Rezyklierungsprozess wieder zur apikalen Membran transportiert. Wie der genaue Mechanismus der Endozytose von Galectin-3 abläuft und ob das aufgenommene Lectin erneut zur apikalen Membran transportiert wird, sollte in diesem Teil der Arbeit näher untersucht werden.

4.2.1 Endozytisiertes Galectin-3 wird zurück an die Zelloberfläche transportiert

Durch vorherige Studien in MDCK-Zellen konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 zuckerabhängig endozytiert wird und nach Aufnahme in Recyclingendosomen unterhalb der apikalen Zelloberfläche akkumuliert (Schneider *et al.*, 2010). Anhand dieser Daten wurde vermutet, dass das Lectin von diesem endosomalen Kompartiment in einem Recyclingweg zurück zur apikalen Oberfläche gelangen kann. Um diesen Recyclingweg von Galectin-3 zu untersuchen, wurden polarisierte MDCK Zellen auf PET-Filtern in 24 Lochschalen kultiviert und mit rekombinantem Galectin-3 inkubiert. Dieses wurde zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 fusioniert (siehe 3.6.2 *Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten Proteinen*). Die Endozytose erfolgte für 20 min bei 37°C, anschließend wurde überschüssiges Galectin-3 durch Waschen entfernt. Nach Zugabe von PBS++ zur apikalen und basolateralen Seite wurden die Zellen für 0 - 150 min bei 37°C inkubiert. Ein zweiter Ansatz wurde als Kontrolle parallel bei 4°C inkubiert. Jeweils nach 30 min wurde der Zellüberstand entnommen. Die Menge an apikal sezerniertem Galectin-3-Alexa488 wurde durch Messung der Fluoreszenzintensität mit Hilfe eines Tecan infinite200 Plattenlesegerätes bestimmt. Während des gesamten Verlaufes der

Messung konnte ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Fig. 4.16 A), was auf eine apikale Sekretion eines beträchtlichen Anteils des vorher internalisierten rekombinanten Galectin-3 hinweist.

Durch Erstellen einer Galectin-3-Alexa488 Konzentrationsreihe konnte weiterhin die Menge an sezerniertem Protein bestimmt werden. Diese belief sich in den ersten 30 min schon auf etwa 0,014 μM und erreichte nach 150 min einen Wert von etwa 0,024 μM . Die gleichbleibende niedrige Fluoreszenzintensität der Kontrolle verdeutlicht, dass Endo- und Exocytose bei 4°C in den MDCK Zellen blockiert ist.

Der Rezyklierungsprozess von Galectin-3 wurde in einem weiteren Experiment untersucht. Dazu wurde die Sekretion von endogenem und rekombinanten Galectin-3 verglichen. Verwendet wurden polare MDCK Zellen auf PET Filtern in 6 Lochschalen, mit denen, wie oben beschrieben, mit rekombinanten humanem Galectin-3 ohne Fluoreszenzmarkierung ein *Uptake* durchgeführt wurde. Nach erfolgter Endozytose wurden die Zellen mit frischem apikalen PBS++ bei 37°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 150 min wurde erneut alle 30 min der Zellüberstand entnommen und zusätzlich ein Zelllysatsatz zu den jeweiligen Zeitpunkten hergestellt. Die apikale sezernierte und in der Zelle befindliche Menge an rekombinanten Protein wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Immunblot bestimmt (Fig. 4.16 B). Endogenes und rekombinantes Galectin-3 wurden dabei mit einem anti-Galectin-3 Antikörper detektiert und anhand ihres Molekulargewichts voneinander unterschieden. Fig. 4.16 C zeigt die Quantifizierung der Western Blots des rekombinanten Galectin-3. Der Anteil an sekretiertem Protein im apikalen Medium und der in der Zelle verbleibende Anteil sind hierbei jeweils auf die Gesamtmenge des rekombinanten Lectins im apikalen Medium und im Zelllysatsatz bezogen. Im apikalen Medium steigt die Menge an rekombinanten Galectin-3 im Verlauf des Versuchs an, während intrazellulär ein deutlicher Abfall zu beobachten ist. Dies zeigt deutlich, dass ein wesentlicher Anteil des rekombinanten Galectin-3 zunächst in die Zelle aufgenommen wird und anschließend wieder zurück an die apikale Zelloberfläche transportiert wird um dort sekretiert zu werden. Dieser Anteil könnte dann erneut für eine Aufnahme und einen neuen Recyclingzyklus

bereitstehen. Gleichzeitig konnte auch ein Anstieg des endogenen Galectin-3 im apikalen Medium beobachtet werden (Fig. 4.16 B cGal-3) während die Menge im Lysat dagegen gleich blieb. Der Anstieg beider Lectine im apikalen Medium lässt sich durch den vorangegangenen Waschschriff mit 150 mM Lactose erklären. Dadurch wurde sämtliches an der Zelloberfläche befindliches Galectin-3 entfernt. Endogenes Galectin-3 wird permanent von der Zelle synthetisiert, was den gleichbleibenden intrazellulären Anteil erklärt. Beim rekombinanten Galectin-3 hingegen handelt es sich um exogen hinzugegebenes Protein, das die Zelle nur kurz durchläuft. Zusammenfassend konnte die Hypothese eines Galectin-3 Rezyklierungsprozesses bestätigt werden, da exogen zugegebenes Galectin-3 in einem Zeitverlauf von 150 min sezerniert wird.

Abb. 4.16 Recycling von endozytiertem Galectin-3.

(A) 1,5 μ M rekombinantes Galectin-3-Alexa488 wurde zum apikalen Medium polarisierter, auf PET Filtern kultivierten MDCK Zellen gegeben. Die Endozytose erfolgte bei 37°C für 20 min. Überschüssiges Protein an der Zelloberfläche wurde entfernt und PBS++ zur apikalen und basolateralen Oberfläche der Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann für 0 - 150 min bei 37°C oder als Kontrolle alternativ bei 4°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Zellüberstand entnommen und die Menge an Galectin-3-Alexa488 mittels einer Fluoreszenzintensitätsmessung bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. **(B)** 1,5 μ M rekombinantes Galectin-3 wurde unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie in (A) von MDCK Zellen endozytiert. Der Anteil von rekombinanten und endogenen Galectin-3 wurde anschließend mittels Western-Blot durch Verwendung eines anti-Galectin-3 Antikörpers analysiert. MDCK_{wt}⁻hGal3⁻: Kontrollzellen ohne rekombinantes Galectin-3 und ohne Entfernung des endogenen Galectin-3 von der Zelloberfläche; hGal-3: rekombinantes humanes Galectin-3; cGal-3: endogenes Galectin-3. **(C)** Quantifizierung der Western Blots von drei Experimenten. Der Anteil an sekretiertem rekombinanten Galectin-3 und der intrazelluläre Anteil wurden auf die Summe des rekombinanten Lectins in apikalem Medium und Lysat bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

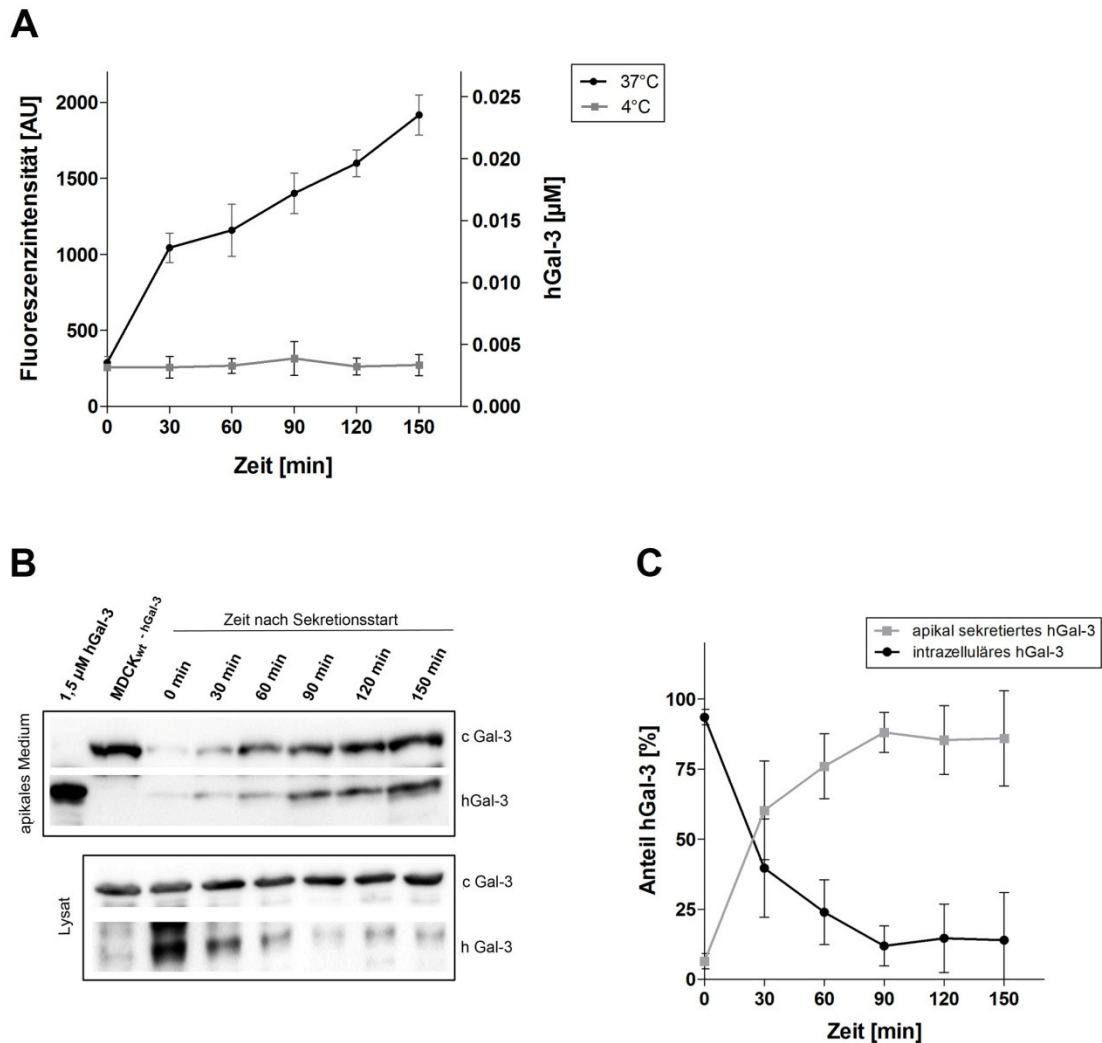


Abb. 4.16 Recycling von endozytiertem Galectin-3. (Legende siehe vorherige Seite)

4.2.2 Galectin-3 wird in Flotillin-1 positiven Vesikeln endozytiert

In 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 nach Aufnahme in die Zelle zur apikalen Zelloberfläche transportiert und sekretiert wird, um dann vermutlich erneut in die Zelle aufgenommen zu werden. Die Aufnahme von Proteinen kann über verschiedene Endozytosemechanismen erfolgen. Dies sind zum einen eine Clathrin-abhängige oder eine Caveolin- bzw. Flotillin-abhängige Endozytose (Perret *et al.*, 2005). Letztere basieren auf Wechselwirkungen mit *lipid rafts*. Durch vorangegangene Experimente konnten bereits erste Hinweise

auf den Endozytoseweg von Galectin-3 erhalten werden. Anhand von Beobachtungen zur Aufnahme von Galectin-3 mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie konnte 10 min nach Start der Endozytose eine Kolokalisation von Galectin-3 mit Flotillin-1 bzw. Caveolin-1 gezeigt werden (Greb, 2011). Eine Kolokalisation mit Clathrin konnte nicht detektiert werden. Zusätzlich konnte durch biochemische Analysen gezeigt werden, dass durch Inhibition der *lipid raft* abhängigen Endozytose mittels Filipin die Aufnahme von Galectin-3 geschwächt ist (Greb, 2011). In einem weiteren Experiment sollte nun mit Hilfe der hochauflösenden GSDIM-Mikroskopie die Kolokalisation von Galectin-3 mit Flotillin-1 näher untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss eines weiteren *lipid raft* Inhibitors, Methyl- β -cyclodextrin, auf die Galectin-3- Aufnahme biochemisch analysiert werden. Für die hochauflösende Mikroskopie wurden stabil transfizierte MDCK_{Flotillin-1-YFP} Zellen auf Deckgläschen verwendet. Die Endozytose von 1,5 μ M rekombinantem Galectin-3 gekoppelt an Alexa647 erfolgte für 10 min bei 37°C. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Methanol fixiert und für die GSDIM-Mikroskopie vorbereitet (siehe auch 3.10.3 GSDIM). Abbildung 4.17 A zeigt repräsentative Beispiele der beobachteten Endozytoseereignisse. Es können vermehrt Flotillin-1 positive vesikuläre Strukturen (grün, durch Pfeil markiert) beobachtet werden, in denen Galectin-3 (rot) zu erkennen ist. Die Größe der Vesikel liegt im Bereich von 200-500 nm. Diese Lokalisation von Galectin-3 in Flotillin-positiven vesikulären Strukturen 10 min nach Endozytose legen nahe, dass das Lectin über Flotillin-assoziierte Endozytose in die Zelle gelangt.

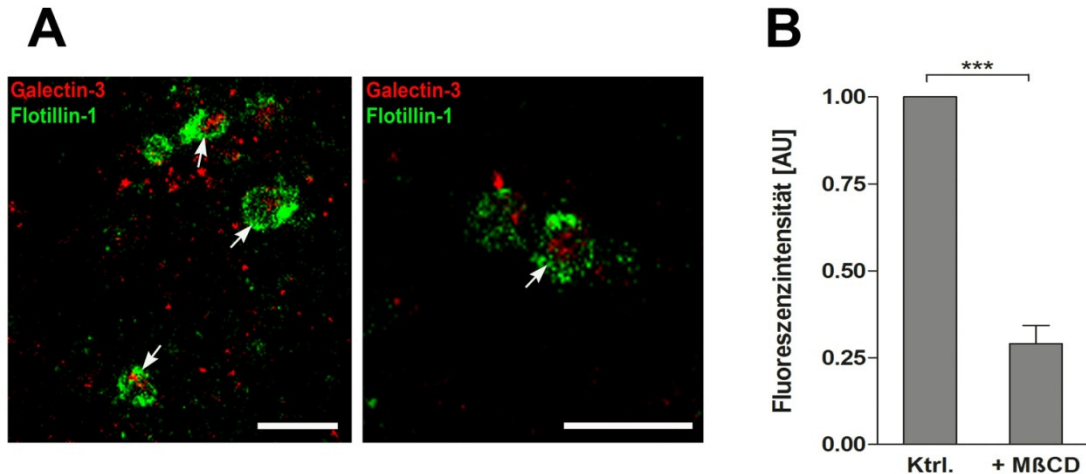


Abb. 4.17 Flotillin-1 abhängige Endozytose von Galectin-3

(A) Rekombinantes Galectin-3-Alexa647 wurde für 10 min bei 37°C in MDCK_{Flotillin-1-YFP} Zellen internalisiert. Galectin-3-Alexa647 (rot) ist in Flotillin-1 positiven vesikulären Strukturen (grün) mittel GSDIM dargestellt. Maßstab: 1 µm. (B) Polare MDCK Zellen wurden mit 10 mM Methyl-β-cyclodextrin, einem Inhibitor der *lipid raft* abhängigen Endozytose, inkubiert. Die Aufnahme von rekombinantem Galectin-3-Alexa647 erfolgte in Anwesenheit des Inhibitors für 30 min bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen auf ihre Fluoreszenzintensität mittels FACS untersucht und auf die Kontrollzellen normalisiert. Die Mittelwerte ± Standardfehler von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand eines ungepaarten t-Tests (**p<0,001). Ktrl.: Kontrollzellen ohne Inhibitorbehandlung.

Zur weiteren Untersuchung der Endozytose von Galectin-3 wurde Methyl-β-cyclodextrin als Inhibitor gewählt. Dieses hemmt die *lipid-raft* abhängige Internalisierung durch Entfernen von Cholesterol. Zur Untersuchung wurden polare MDCK Zellen auf 24 Lochschalen mit 10 mM Methyl-β-cyclodextrin für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Internalisierung von 1,5 µM rekombinantem Galectin-3-Alexa647 in Anwesenheit von 10 mM Methyl-β-cyclodextrin für 30 min bei 37°C. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA von der Schale abgelöst und in PBS resuspendiert. Die Fluoreszenzintensität Methyl-β-cyclodextrin behandelte Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt und mit Kontrollzellen ohne Inhibitorbehandlung verglichen. Abb. 4.17 B zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten normalisiert auf Kontrollzellen. Die Quantifizierung zeigt eine

signifikante Reduktion der Aufnahme von Galectin-3-Alexa647 in Anwesenheit von Methyl- β -cyclodextrin ($***p < 0,001$). Dies bestätigt die Hypothese von einer *lipid raft* abhängigen Internalisierung von Galectin-3 (Greb, 2011).

4.2.3 Galectin-3 wechselt zwischen einem DRM-assozierten und nicht-assozierten Status

Die in 4.2.1 und 4.2.2 dargestellten Experimente konnten den Rezyklierungsprozess sowie die Flotillin-Abhängigkeit der Endozytose von Galectin-3 zeigen. Nach einer *lipid raft* abhängigen Aufnahme des Lectins gelangt dieses in den sekretorischen Weg, wird an der apikalen Zelloberfläche sezerniert und kann vermutlich erneut wieder in die Zelle aufgenommen werden. Während der Exozytose fungiert Galectin-3 als apikale Sortierplattform für *lipid raft* unabhängige Proteine (Delacour *et al.*, 2006). Somit liegt die Vermutung nahe, dass Galectin-3 zwischen einer *lipid raft* unabhängigen Exozytose und einer *lipid raft* abhängigen Endozytose wechselt.

Die Assoziation von Galectin-3 mit *lipid rafts* während der Endozytose konnte in früheren Untersuchungen anhand von *DRM-Floating*-Analysen bereits nachgewiesen werden (Straube, 2009). Diese Experimente wurden in dieser Arbeit fortgesetzt und sind in Abb. 4.18 A, B noch einmal dargestellt. Extrazelluläres Galectin-3 kann über kohlenhydrathaltige Bindungen mit der extrazellulären Matrix interagieren und die Internalisierung von Proteinen, wie im Falle von β -1Integrin gezeigt werden konnte, durch Caveolin-haltige Vesikel initiieren (Furtak *et al.*, 2001; Ochieng *et al.*, 2004). Deshalb wurde neben einer Galectin-3-YFP (Gal3-YFP) stabil exprimierenden MDCK Zelllinie eine weitere MDCK Zelllinie verwendet, die eine mutierte Variante von Galectin-3, hier jedoch mit GFP fusioniert (Gal-3-R186S-GFP) exprimiert. In dieser Mutante wurde in der Kohlenhydratbindungsdomäne ein Arginin gegen ein Serin ersetzt, wodurch sie, im Vergleich zum Galectin-3 Wildtyp eine vierfach verminderte Bindeaffinität zu Lactose besitzt. Die *DRM-Floating* Analysen wurden mit Hilfe von Nycodenzgradienten durchgeführt, da Nycodenz im Gegensatz zur üblich verwendeten Saccharose, nicht zu unspezifischen Bindungen führt. Zur Untersuchung der *DRM*-Assoziation von Galectin-3 wurde zunächst sämtliches

an der Zellmembran befindliche Galectin-3 durch Waschen mit Trypsin entfernt. Anschließend wurden die Proteine des sekretorischen Weges mittels TGN-Block bei 20°C im TGN akkumuliert und die Proteinneusynthese durch Zugabe von Cycloheximid unterbunden. Durch anschließende Inkubation der Zellen bei 37°C wurde der TGN-Block aufgehoben und die Proteine wieder an die apikale Zellmembran transportiert (siehe auch 3.5.9 TGN-Exit). Anschließend erfolgte 0 min, 60 min und 120 min nach TGN-Block eine DRM-Floating-Analyse (siehe auch 3.7.4 DRM-Floating Analyse von MDCK II Zellen). Die dabei gesammelten 12 Fraktionen wurden unter Verwendung eines anti-GFP Antikörpers auf die Existenz von Galectin-3 untersucht. Als Markerprotein für DRMs diente Caveolin-1, dass in den Fraktion 3 - 5 identifiziert werden konnte. Wie schon aus vorherigen Experimenten bekannt (Delacour *et al.*, 2006), akkumuliert Galectin-3 nicht in den DRM-Fraktionen im *steady state* Zustand (Abb. 4.18 A, links). Zum Zeitpunkt 0 min ist ein sehr geringer Anteil des Lectins mit DRMs assoziiert, während der restliche Anteil nicht assoziiert ist (Abb. 4.18 A, B, links). 60 min nach TGN-Exit lässt sich allerdings ein signifikanter Anteil von etwa 91 % an Galectin-3 in DRM-Fraktionen nachweisen. Dieser Anteil sinkt nach weiteren 60 min auf etwa 10 % ab und der nicht-DRM-assozierte Anteil an Galectin-3 steigt dementsprechend wieder an. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Galectin-3 in dem gemessenen Zeitraum zwischen einem *lipid raft* assoziierten und einem nicht *lipid raft* assoziierten Zustand wechselt.

Abb. 4.18 Galectin-3 wechselt zuckerabhängig zwischen einem DRM-assozierten und nicht-assozierten Status

(A) TGN-Exit-Analyse von polarisierten MDCKGal-3-YFP und MDCKGal-3-R186S-GFP Zellen mit anschließender DRM-Isolation zu unterschiedlichen Zeitpunkten. DRMs wurden mit Hilfe eines anti-Caveolin-1-Antikörpers identifiziert, Galectin-3 positive Fraktionen durch Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers. (B) Quantifizierung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. n.d.: nicht detektierbar.

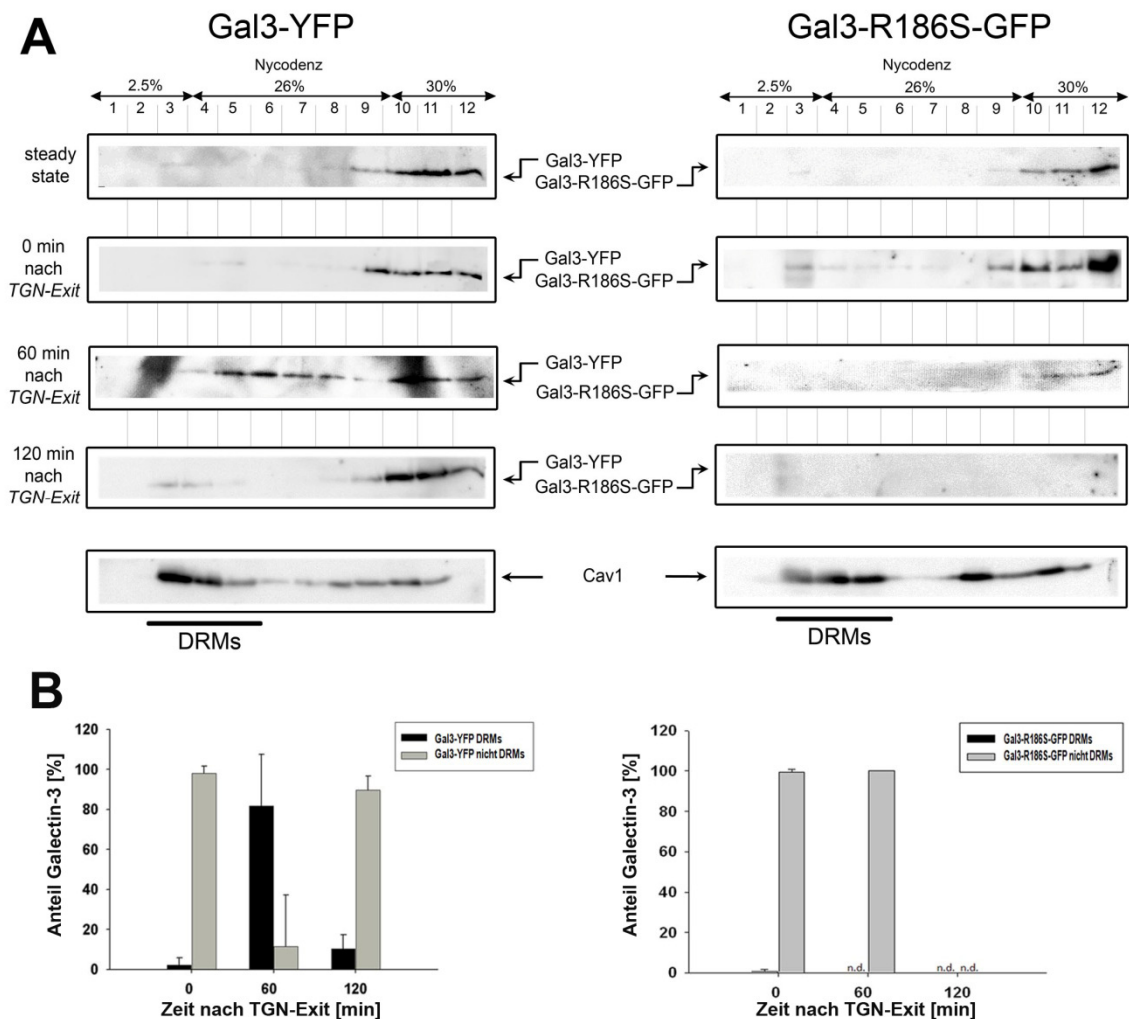


Abb. 4.18 Galectin-3 wechselt zuckerabhängig zwischen einem DRM-assozierten und nicht-assozierten Status (Legende siehe vorherige Seite)

Betrachtet man sich die mutierte Form des Galectin-3 (Gal-3-R186S-GFP), befindet sich im *steady state* Zustand und 0 min nach TGN-Exit ebenfalls nur ein sehr geringer Anteil von Galectin-3 (0,5 %) in den DRM-Fraktionen (Abb. 4.18 A, rechts). Im Vergleich zu Galectin-3-YFP kann 60 min nach TGN-Exit jedoch keine DRM-Assoziation von Galectin-3-R186S festgestellt werden; der nicht-DRM-assozierte Anteil beläuft sich daher auf etwa 100 %. Nach weiteren 60 min ist die mutierte Form des Lectins nicht mehr detektierbar. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Assoziation von Galectin-3 mit DRMs und der Transport zurück in die Zelle von der Zuckerbindung des Lectins abhängig sind.

Die Assoziation von Galectin-3 mit *lipid rafts* könnte anhand von alternierenden Galectin-3 Interaktionen mit Glykoproteinen erklärt werden, die aufgrund des wechselnden pH-Wertes zwischen den leicht sauren endosomalen Kompartimenten und der neutralen Zelloberfläche entstehen. Um der Frage nach dem Einfluss des pH-Wertes auf die DRM-Assoziation nachzugehen, wurde die Aufnahme von extern zugegebenem Galectin-3 in Anwesenheit von Chloroquin untersucht, dass zur Neutralisierung des pH-Werts in den Endosomen führt (Murphy *et al.*, 1984).

In einem Kontrollexperiment wurde zunächst die Neutralisation der Endosomen in MDCK-Zellen durch Chloroquin überprüft (Abb. 4.19). Dazu wurde rekombinantes Galectin-3 mit pHrodo, einem pH sensitivem Fluorophor gekoppelt. PHrodo fluoresziert in saurem pH stark im roten Bereich, bei neutralem pH weist es jedoch fast keine Fluoreszenz auf. Dieses wurde dann in An- und Abwesenheit von 60 µg/mL Chloroquin zur apikalen Oberfläche polarisierter MDCK-Zellen gegeben und anschließend für die Mikroskopie vorbereitet (siehe 3.10.1 *Lebendzellbeobachtung*). Die Endozytose von Galectin-3-pHrodo erfolgte in der Inkubationskammer des Mikroskops bei 37°C; über einen Zeitraum von 30 min wurden hierbei z-Stapel im Abstand von jeweils 2,5 min aufgenommen. In den Chloroquin-behandelten Zellen zeigte sich auch 30 min nach Aufnahme des Lectins keine Fluoreszenz, im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen. Dies deutete auf eine erfolgreiche Neutralisation der Endosomen hin.

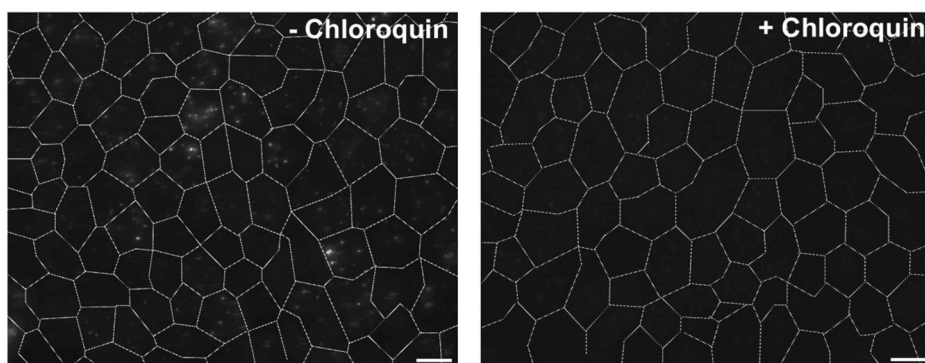


Abb. 4.19 Aufnahme von Galectin-3-pHrodo nach endosomaler Neutralisation (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 4.19 Aufnahme von Galectin-3-pHrodo nach endosomaler Neutralisation

Voll auspolarisierte MDCK Zellen wurden 1 h mit Chloroquin inkubiert. Anschließend wurde rekombinantes Galectin-3 konjugiert mit pHrodo in Anwesenheit von Chloroquin zum apikalen Medium gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Filter ausgeschnitten, und in einer Bachoferkammer bei 37°C in PBS inkubiert, so dass das fluoreszenzmarkierte Galectin-3 in die Zellen aufgenommen werden konnte. Die Fluoreszenz von pHrodo wurde über einen Zeitraum von 30 min alle 2,5 min durch Aufnahme eines z-Stapels untersucht. Maßstab: 10 µm.

Für die Untersuchung der Galectin-3 Assoziation zu *lipid rafts* nach Neutralisation des endosomalen pHs, wurde rekombinantes Galectin-3 in An- oder Abwesenheit von Chloroquin zur apikalen Oberfläche polarer MDCK Zellen gegeben und die Internalisierung des Lectins durch Inkubation bei 37°C gestartet. Zelllysate wurden 0 min, 30 min und 60 min nach Start der Endozytose hergestellt und eine DRM-*Floating*-Analyse durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Immunoblot-Analyse untersucht. Die DRM-positiven Fraktionen wurden mittels eines anti-Caveolin-1 Antikörpers identifiziert und zur Detektion des endogenen und rekombinanten Galectin-3 wurde ein polyklonaler anti-Galectin-3 Antikörper verwendet. Abb. 4.20 zeigt die Ergebnisse der Western Blots der Kontrollzellen (links) und der Chloroquin behandelten Zellen (rechts). Bei den Kontrollzellen zeigt sich kurz vor Beginn der Aufnahme des Lectins (Zeitpunkt 0 min), dass nur ein geringer Anteil von etwa 25 % des gesamten Galectin-3 in den DRM-Fraktionen zu finden ist, während sich der Großteil in den nicht *lipid raft* Fraktionen befindet. Der DRM-assoziierte Anteil verringert sich nach 30 min *Uptake* merklich und lässt sich nach weiteren 30 min nicht mehr detektieren. Diese Beobachtung zeigt, dass Galectin-3 nach einer *lipid raft* abhängigen Aufnahme in einen *lipid raft* unabhängigen Status wechselt. Das endogene Galectin-3 zeigt zu keinem der Zeitpunkte eine Assoziation mit *lipid rafts*, was sich dadurch erklären lässt, dass es sich hierbei wieder um den *steady state* Zustand handelt, der, wie bereits in Abb. 4.18 A gezeigt, überwiegend durch nicht-*raft* assoziiertes Galectin-3 gekennzeichnet ist.

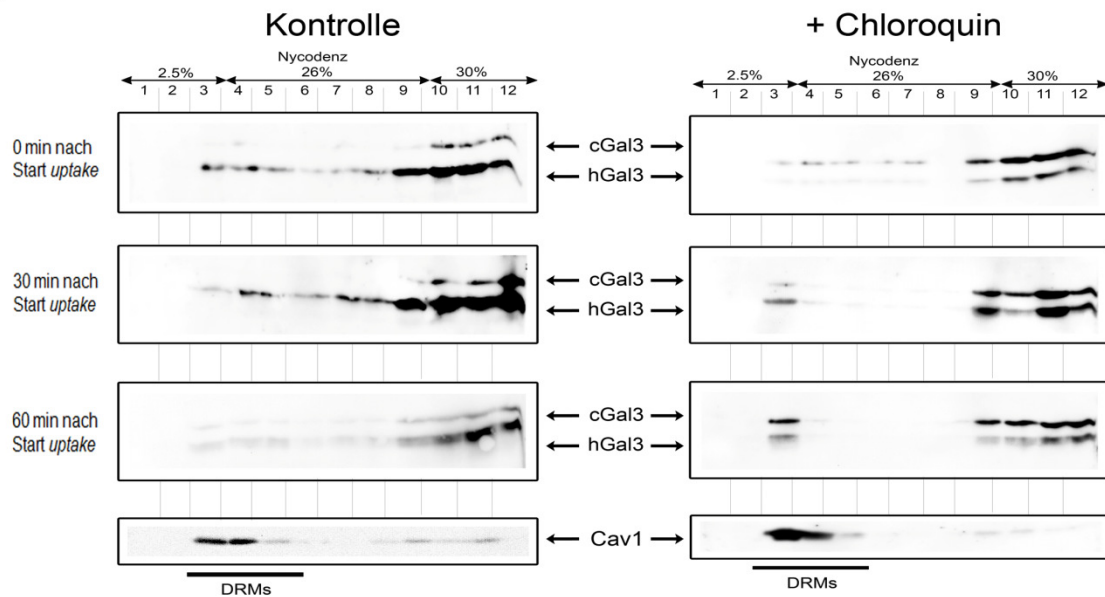


Abb. 4.20 pH-abhängiger Wechsel von Galectin-3 zwischen einem DRM-assozierten und nicht-assozierten Status

Polarisierte MDCK wurden zur Neutralisierung des endosomalen pHs 1h mit bzw. als Kontrolle ohne 60 µg/mL Chloroquin inkubiert. Anschließend wurde rekombinantes Galectin-3 in An- oder Abwesenheit von Chloroquin für die angegebenen Zeitpunkte auf die Zellen gegeben und die Endocytose bei 37°C gestartet. Nach den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und mittels DRM-Fraktionierung mit anschließender SDS-PAGE und Western Blot auf Caveolin-1 als DRM-Marker und Galectin-3 untersucht. cGal-3: endogenes canines Galectin-3; hGal-3: rekombinantes humanes Galectin-3.

Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigt sich bei den Chloroquin behandelten Zellen, dass rekombinantes und endogenes Galectin-3 zu allen Zeitpunkten der Aufnahme mit DRMs assoziiert ist. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der endosomale pH-Wert einen erheblichen Einfluss auf die Assoziation von Galectin-3 mit DRMs hat und dass eine Neutralisation der Endosomen den Wechsel zwischen einem *lipid raft* assoziierten und einem nicht *raft* assoziierten Status verhindert.

4.2.4 Die apikale Aufnahme von Galectin-3 ist abhängig vom pH-Wert

Aufgrund der gemachten Beobachtungen zur Endozytose von Galectin-3 und dem Einfluss des pH-Wertes auf die Assoziation des Lectins mit DRMs sollte nun herausgefunden werden, ob Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes einen Einfluss auf die Aufnahme von Galectin-3 haben.

Für diesen Versuch wurde EPPS-Puffer mit neutralem oder leicht saurem pH verwendet. Durch seine membranimpermeable Eigenschaft kann der extrazelluläre pH-Wert mit diesem Puffer manipuliert werden, ohne den zytosolischen pH zu beeinflussen (Berka *et al.*, 2009). Durch die Verwendung der pH-Werte 7,4; 6,5 und 5,9 im extrazellulären EPPS Puffer sollte ein pH-Gradient erzeugt werden, wie er zwischen der Zelloberfläche und den Endosomen besteht (Yamashiro und Maxfield, 1987).

Für diesen Versuch wurden polarisierte MDCK Zellen auf PET-Filtern verwendet. Rekombinantes Galectin-3 wurde in Anwesenheit von EPPS-Puffer (pH 7,4, 6,5 oder 5,9) zur apikalen Oberfläche der Zellen gegeben. Die Aufnahme des Lectins erfolgte für 0 min, 30 min und 60 min bei 37°C. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde an der Zelloberfläche befindliches Galectin-3 mit eiskalter 0,2 % Essigsäure entfernt, die Zellen anschließend lysiert und mittels Western Blot analysiert (Abb. 4.21 A). Endogenes und rekombinantes Galectin-3 wurden dabei mit einem anti-Galectin-3 Antikörper detektiert. Bei der Normalisierung der Menge des aufgenommenen rekombinanten Galectin-3 wurde auf 2 µM zugegebenes Protein normalisiert (Abb. 4.21 B). Unmittelbar nach Start der Endozytose befindet sich bei allen pH Werten nur ein sehr geringer Anteil (ca. 11 %) des extern zugegebenen Galectin-3 im Zelllysats. 30 min nach Endozytosestart steigt der Anteil bei pH 7,4 auf 26 ± 4 % und nach weiteren 30 min befinden sich 33 ± 8 % des Lectins in der Zelle.

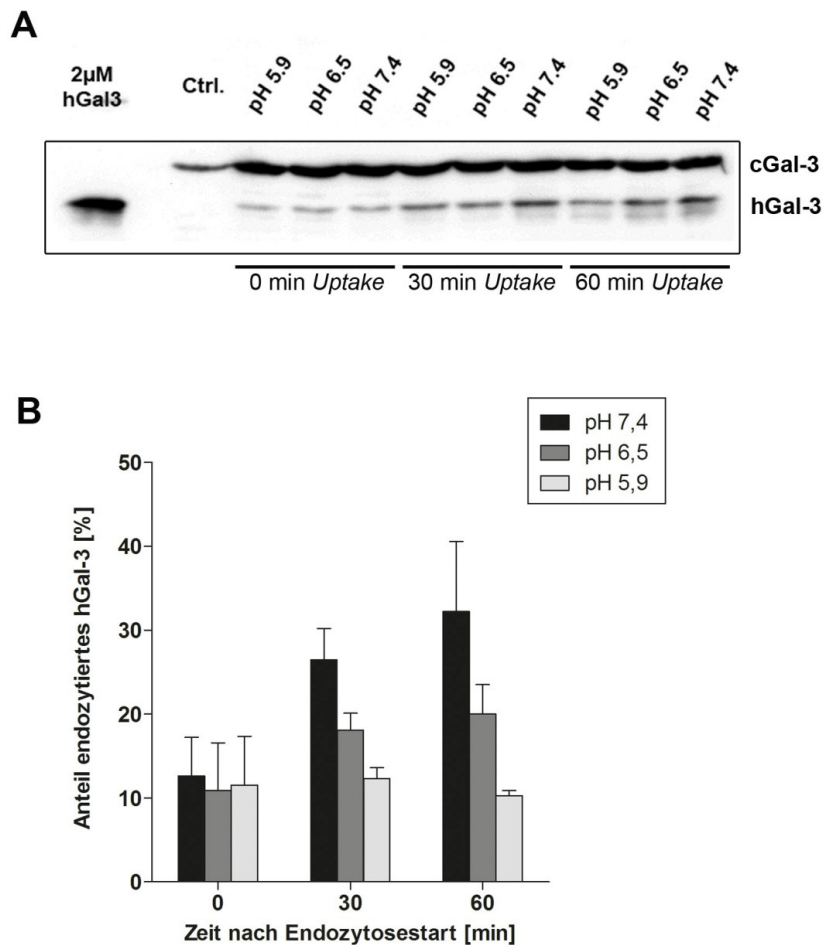


Abb. 4.21 pH-abhängige Aufnahme von rekombinantem Galectin-3

(A) 2 μ M rekombinantes humanes Galectin-3 wurden in Anwesenheit von EPPS-Puffer pH 7,4; 6,5 und 5,9 zur apikalen Zelloberfläche von polarisierten MDCK Zellen gegeben. Die Zellen wurden zur Aufnahme des Proteins für 0 min, 30 min und 60 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde überschüssiges rekombinantes Lectin von der Zelloberfläche entfernt und die Zellen lysiert. Endogenes und rekombinantes Galectin-3 wurden mit einem anti-Galectin-3 Antikörper im Western Blot analysiert. Die Kontrollzellen erhielten kein rekombinantes Protein. cGal-3: endogenes canines Galectin-3; hGal-3: rekombinantes humanes Galectin-3. (B) Die Menge des aufgenommenen Lectins bei unterschiedlichen pH-Werten wurde in drei unabhängigen Western Blots quantifiziert und auf 2 μ M zugegebenes Galectin-3 normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Im Gegensatz dazu ist der Anteil an endozytiertem Galectin-3 bei pH 6,5 geringer und beträgt nach 30 min 18 ± 2 % und nach 60 min 20 ± 4 %. Bei einem pH-Wert von 5,9 ist keine Steigerung der Internalisierung des Lectins zu

beobachten. Die Menge des endogenen caninen Galectin-3 (cGal-3) ist zu allen Zeitpunkten gleichbleibend.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Endozytose von Cholera toxin Untereinheit B, einem DRM-assoziierten Kontrollprotein und Galectin-3- Δ N (Galectin-3 ohne N-terminale Domäne) untersucht. Durch die Verwendung von Galectin-3- Δ N sollte festgestellt werden, ob der pH-Wert einen Einfluss auf eine mögliche *cluster*-Bildung des Lectins hat und dadurch die Endozytose beeinflusst wird. Rekombinantes Galectin-3, rekombinantes Galectin-3- Δ N und Cholera toxin Untereinheit B wurden für diesen Versuch mit Alexa647 gekoppelt (siehe 2.6.2 *Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten Proteinen*). 1,5 μ M Protein wurden in Anwesenheit von EPPS-Puffer mit den jeweils unterschiedlichen pH-Werten auf die apikale Zelloberfläche von polarisierten MDCK Zellen gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Aufnahme des Proteins erfolgte bei 37°C für 1 h. An der Zelloberfläche verbliebenes Galectin-3 wurde mit 150 mM Lactose entfernt. Anschließend wurden die Zellen per FACS-Analyse untersucht (siehe auch 3.7.3 *Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)*). Abb. 4.22 A zeigt repräsentative FACS-Daten der Aufnahme von Galectin-3 bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zu Kontrollzellen ohne rekombinantes Galectin-3. Nach Bestimmung einer Zellpopulation wurde die Fluoreszenzintensität der Alexa647 gekoppelten Proteine mit Hilfe des APC Kanals (Allophycocyanin, Anregung: 635 nm, Emission: 660 nm) bestimmt. Anhand der Rohdaten lässt sich bereits eine deutliche Aufnahme des rekombinanten Proteins bei pH 7,4 feststellen und eine Verringerung des Fluoreszenzsignals bei pH 6,5 und pH 5,9. Die Quantifizierung in Abb. 4.22 B zeigt die Fluoreszenzsignale von Galectin-3-Alexa647, Cholera toxin Untereinheit B-Alexa647 und Galectin-3- Δ N-Alexa647 in Abhängigkeit der pH-Werte. Normalisiert wurde auf das Fluoreszenzintensitätsprofil bei pH 7,4. Die FACS-Daten bestätigen die aus den Western Blots gewonnen Beobachtungen, dass die effektivste Aufnahme von Galectin-3 bei einem pH-Wert von 7,4 stattfindet. Die Endozytose von Cholera toxin Untereinheit B wird dagegen nicht vom pH Wert beeinflusst. Die Betrachtung der mutierten Form Galectin-3- Δ N zeigt den gleichen Einfluss des

pH-Wertes auf die Endozytose wie bei Galectin-3, d.h. die stärkste Aufnahme des Proteins findet bei pH 7,4 statt und sinkt mit zunehmender Azidifikation des extrazellulären pH.

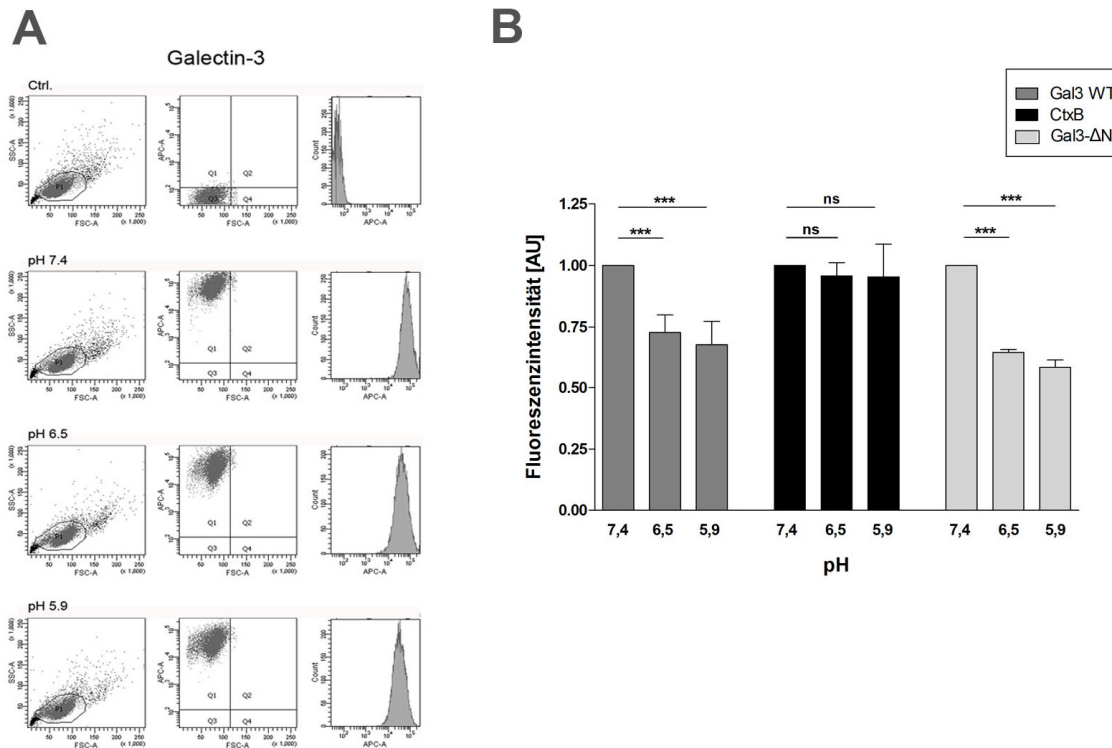


Abb. 4.22 Einfluss des pH Wertes auf die Endozytose von Galectin-3, Galectin-3-ΔN und Cholera toxin Untereinheit B

1,5 μ M rekombinantes Galectin-3-Alexa647, Galectin-3-ΔN-Alexa647 und Cholera toxin Untereinheit B-Alexa647 in EPPS-Puffer pH 7,4; 6,5 und 5,9 wurden durch Inkubation bei 37°C für 1 h von polaren MDCK Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend mittels FACS auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht. **(A)** Repräsentative FACS-Rohdaten von polaren MDCK Zellen nach Aufnahme von Galectin-3-Alexa647 in EPPS-Puffer pH 7,4; 6,5 und 5,9 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. APC-A, FACS-Kanal zur Messung der Fluoreszenzintensität von Alexa647 **(B)** Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von Gal-3-Alexa647, Gal-3-ΔN-Alexa647 und CtxB-Alexa647 bei unterschiedlichem pH von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten normalisiert auf das Fluoreszenzintensitätsprofil bei pH 7,4. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni's Post-Hoc-Test (** $p < 0,001$). Gal-3 WT: Galectin-3-Alexa647; CtxB: Cholera toxin Untereinheit B-Alexa647; Gal-3-ΔN: Galectin-3-ΔN-Alexa647; ns: nicht signifikant.

4.2.5 Rekombinantes Galectin-3 stellt die Sortierung des Neurotrophinrezeptors p75 wieder her

In vorangegangenen Untersuchungen konnte Galectin-3 bereits als apikaler Sortierrezeptor für den Neurotrophinrezeptor p75 identifiziert werden. Eine Depletion von Galectin-3 in MDCK Zellen führte weiterhin zu einer Fehlsortierung des Membranproteins p75 zur basolateralen Zellmembran (Delacour *et al.*, 2006). Bisher war jedoch unbekannt, ob eine Zugabe von rekombinantem Galectin-3 diese Fehlsortierung nach Depletion von endogenem Galectin-3 komplementieren kann. Daher wurden MDCK_{p75-GFP} Zellen auf PET-Filtern in 6- und 24-Lochschalen kultiviert, bis sie vollständige polarisiert waren. Endogenes Galectin-3 wurde mittels siRNA Transfektion depletiert (siehe 3.4.6 *RNA-Interferenz*). Als Kontrolle diente die Transfektion der Zellen mit einer siRNA gegen Luciferase. Im Anschluss an den *knock down* Die Filter in 24-Lochschalen wurden anschließend ausgeschnitten, fixiert und mittels KLSM auf die Verteilung von p75-GFP untersucht (siehe 3.9.4 *Vorbereitung von Zellen ohne Immunfluoreszenzfärbung*). Dabei wurden Aufnahmen der xy-Ebene aus dem apikalen und dem basolateralen Bereich der Zellen gemacht, sowie Aufnahmen der xz-Ebene um den Neurotrophinrezeptor besser zu lokalisieren. Zellen auf PET-Filtern in 6-Lochschalen wurden nach Internalisierung des rekombinanten Lectins einer Oberflächenbiotinylierung der apikalen und basolateralen Zellmembran unterzogen (siehe 3.6.5 *Oberflächenbiotinylierung*); die Verteilung von p75-GFP mittels SDS-PAGE und Western Blot wurde unter Verwendung eines anti-GFP Antikörpers analysiert. Endogenes und rekombinantes Galectin-3 wurden mit Hilfe eines anti-Galectin-3 (169) Antikörpers detektiert, als Kontrolle diente α -Tubulin.

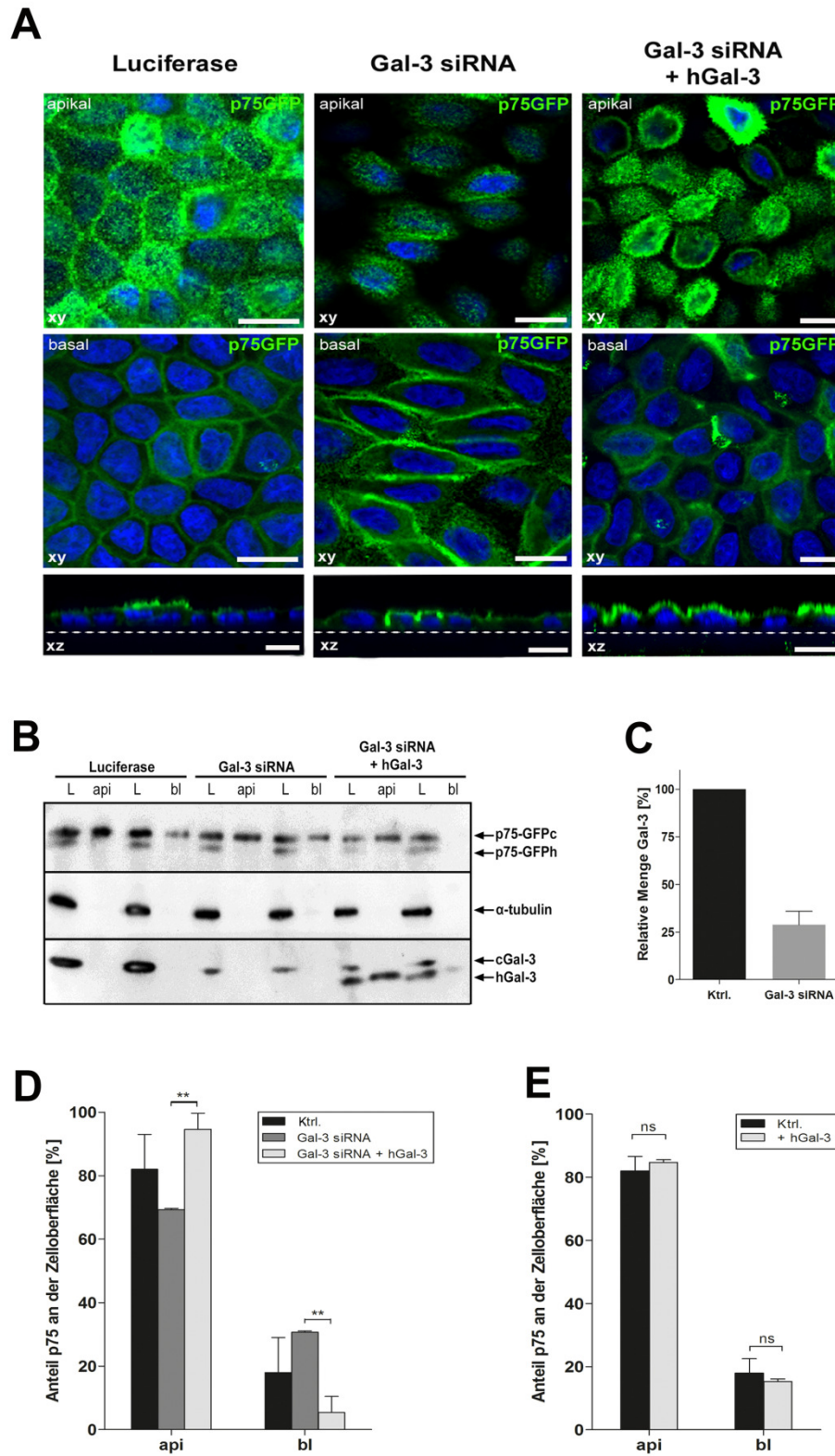


Abb. 4.23 Rekombinantes Galectin-3 stellt die apikale Sortierung von p75-GFP nach Galectin-3 *knock down* wieder her (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 4.23 Rekombinantes Galectin-3 stellt die apikale Sortierung von p75-GFP nach Galectin-3 *knock down* wieder her

Auf PET-Filtern kultivierte MDCK_{p75GFP} Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Galectin-3 spezifischer siRNA oder Luciferase siRNA als Kontrolle transfiziert. Anschließend erfolgte die Aufnahme von 5 µM rekombinantem Galectin-3 für 1 h bei 37°C. **(A)** Die Zellen wurden mittels KLSM durch Aufnahmen in den xy- und xz-Ebenen auf die Verteilung von p75-GFP untersucht. Die Lage der Filter ist in den xz-Aufnahmen durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 blau gefärbt. Maßstab: 10 µm. **(B)** Verteilung von p75-GFP mittels Oberflächenbiotinylierung und Immunoblot Analyse mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers. Der Galectin-3 *knock down* wurde mit Hilfe eines anti-Galectin-3 Antikörpers kontrolliert, als interne Kontrolle wurde α-Tubulin verwendet. P75-GFPc: komplex glykosylierte Form; p75-GFP_h: *high-mannose* Form; cGal-3: endogenes canines Galectin-3; hGal-3: rekombinantes humans Galectin-3; L: Lysat; api: apikal; bl: basolateral. **(C)** Galectin-3 *knock down* Effizienz quantifiziert aus (B). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler der Menge an Galectin-3 in siRNA transfizierten Zellen bezogen auf Luciferase transfizierte Kontrollzellen. **(D)** Quantifizierung der Membranverteilung von p75-GFP aus (B). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte anhand eines ungepaarten t-Tests (**p < 0,01). **(E)** Quantifizierung der Verteilung von p75-GFP von MDCK_{p75-GFP} Zellen ohne Depletion des endogenen Galectin-3 nach Aufnahme von 5 µM hGal-3 verglichen mit Kontrollzellen (Ktrl.) ohne hGal-3 Aufnahme. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte anhand eines ungepaarten t-Test (**p < 0,01). ns: nicht signifikant.

Den Erfolg des Galectin-3 *knock down* zeigt Abb. 4.23 C; es wurde eine *knock down* Effizienz von etwa 75 % erreicht.

Die konfokalen Aufnahmen in Abb. 4.23 A zeigen in den Kontrollzellen eine überwiegend apikale Lokalisation von p75-GFP. Nach *knock down* des endogenen Galectin-3 ist allerdings eine gesteigerte Sortierung von p75-GFP zur basolateralen Zellmembran zu beobachten (Abb. 4.23 A, Mitte). Diese Fehlsortierung lässt sich jedoch durch die Zugabe von rekombinantem Galectin-3 wieder revidieren, was in Abb. 4.23 A an der verstärkten apikalen Lokalisation von p75-GFP zu erkennen ist. Die biochemische Untersuchung der Verteilung von p75-GFP zeigt im Western Blot bei den Kontrollzellen eine starke apikale Sortierung des Neurotrophinrezeptors. Nach Galectin-3 Depletion konnte wie in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse eine reduzierte apikale Lokalisation

bei gleichzeitig stärkerer basolaterale Lokalisation von p75-GFP im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden (Abb. 4.23 B). Nach Inkubation der Zellen mit rekombinantem Galectin-3 wird dieser Effekt der basolateralen Fehlsortierung aufgehoben; die Quantifizierung zeigt, eine Erhöhung des apikalen Anteils des Rezeptors von etwa 25 %. (Abb. 4.23 B, D). Auffällig dabei ist, dass die apikale Sortierung von p75-GFP im Vergleich zu den Kontrollzellen etwas stärker ist, wodurch die Vermutung aufkam, dass durch Zugabe von rekombinantem Protein nicht nur die ursprüngliche Sortierung wiederhergestellt wird, sondern auch, dass es zusätzlich zu einer Verstärkung der apikalen Sortierung kommt. Zudem konnte keine Veränderung des Verhältnisses von Neurotrophinrezeptor im Zelllysat zur Zellmembran festgestellt werden. Dies bestärkt die Vermutung, dass Galectin-3 einen Einfluss auf die Sortierung des Neurotrophinrezeptors hat.

In einem weiteren Experiment sollte nun untersucht werden, ob sich die apikale Sortierung von p75-GFP durch Zugabe von rekombinantem Galectin-3 steigern lässt. Dazu wurden polare MDCK_{p75GFP} Zellen auf PET-Filtern in 6-Lochschalen verwendet und mit 5 μ M rekombinantem Galectin-3 inkubiert. Die Internalisierung des Lectins erfolgte für 1h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen einer Oberflächenbiotinylierung unterzogen und die Verteilung von p75-GFP mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 4.23 E). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die apikale Sortierung von p75-GFP durch Zugabe von rekombinantem Galectin-3 im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht beeinflusst wird. Diese Beobachtungen zeigen bereits eine optimale Sortierung des Neurotrophinrezeptors, die nicht durch Zugabe von rekombinantem Galectin-3 gesteigert werden kann. Rekombinantes Galectin-3 ist allerdings in der Lage eine durch Depletion des endogenen Proteins verursachte Fehlsortierung von p75-GFP zu komplementieren und die apikale Sortierung wieder herzustellen.

4.2.6 Die apikale Sortierung des Neurotrophinrezeptors p75 und die apikale Sekretion des löslichen Glykoproteins gp80 sind abhängig vom pH-Wert

Durch vorangegangene Experimente konnte bereits ein Einfluss des pH-Wertes auf die Endozytose von Galectin-3 sowie eine Interaktion des Proteins mit DRMs festgestellt werden. Ob eine Neutralisation des pH-Wertes in leicht sauren endosomalen Kompartimenten einen Einfluss auf die von Galectin-3 vermittelte apikale Sortierung von p75-GFP sowie auf die Sekretion des Glykoproteins gp80 hat, ist bislang unbekannt.

Zur Verschiebung des sauren endosomalen pH-Wertes in basischere Bereiche wurde Ammoniumchlorid (NH_4Cl) in einer Konzentration von 20 mM und 50 mM verwendet (siehe auch 3.7.5 *NH_4Cl -Behandlung*).

In einem Vorversuch wurde überprüft, ob NH_4Cl tatsächlich zu einer Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich führt. Dazu wurden MDCK_{p75GFP} Zellen auf PET-Filtern kultiviert und mit 1,5 μM Galectin-3, das mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff pHrodo gekoppelt war, für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Aufnahme des Proteins wurde in der Inkubationskammer des Leica DMI6000B Epifluoreszenzmikroskops bei 37°C gestartet. Nach 30 min wurden 20 mM bzw. 50 mM NH_4Cl zugegeben. Die Fluoreszenzintensität von pHrodo wurde durch Aufnahme eines xz-Stapels alle 2,5 min für eine Zeitspanne von 75 min beobachtet. Abb. 4.24 A zeigt, dass nach Erreichen des sauren endosomalen Kompartiments, die Fluoreszenzintensität von pHrodo ansteigt (- NH_4Cl). Durch Zugabe von 20 mM bzw. 50 mM NH_4Cl verschiebt sich der endosomale pH in den basischen Bereich und die Fluoreszenzintensität von pHrodo wird deutlich reduziert (Abb. 4.24 A, B).

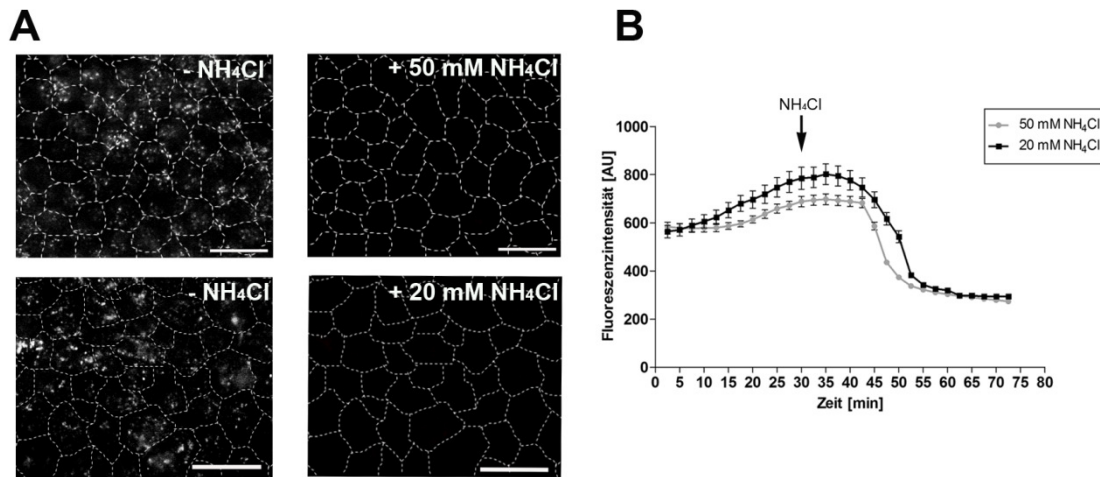


Abb. 4.24 Reduktion der Fluoreszenzintensität von pHrodo durch Anwesenheit von NH_4Cl

(A) 1,5 μM rekombinantes Galectin-3-pHrodo wurde zu $\text{MDCK}_{\text{p75GFP}}$ Zellen auf PET-Filtern gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden die Filter ausgeschnitten und kopfüber in eine PBS gefüllte Bachoferkammer gelegt. Die Aufnahme des Lectins erfolgte bei 37°C in der Inkubationskammer des Mikroskops. Die Fluoreszenzintensität von pHrodo wurde alle 2,5 min mittels xz-Stapel aufgenommen. Nach 30 min wurden 20 mM bzw. 50 mM NH_4Cl zugegeben und die Aufnahmen fortgesetzt. (B) Zeitreihe der Fluoreszenzintensität von pHrodo. Die Zugabe der jeweiligen Ammoniumchlorid Konzentrationen erfolgte nach 30min (Pfeil).

Für die Untersuchung der Sekretion von gp80 und der Oberflächenexpression von p75 wurden $\text{MDCK}_{\text{p75GFP}}$ Zellen sechs Tage auf PET-Filtern in 6-Lochschalen kultiviert. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Vollmedium gegen Vollmedium mit 20 mM bzw. 50 mM Ammoniumchlorid in An- oder Abwesenheit von 50 mM Lactose ausgetauscht. Die Lactose diente zur Blockierung der CRD von Galectin-3. Die Zellen wurden gewaschen und mit serumfreiem Medium ohne Phenolrot mit 20 mM und 50 mM NH_4Cl mit oder ohne 50 mM Lactose für weitere 2 h inkubiert. Das entnommene apikale und basolaterale Medium wurde im Western Blot auf die Menge an sekretiertem gp80 untersucht (siehe 3.7.6 *Sekretionsassay und Oberflächenbiotinylierung*). Nach Abnahme des Mediums wurden apikale und basolaterale Membran der Zellen mittels Oberflächenbiotinylierung (siehe 3.6.5 *Oberflächenbiotinylierung*) markiert und mittels Western Blot auf die Verteilung von p75-GFP untersucht.

Die Western Blots in Abbildung 4.25 A und C bestätigen die aus der Literatur bekannte, vermehrte apikale Sortierung von gp80 (Urban *et al.*, 1987). Bei der Quantifizierung wurden die Banden des glykosylierten Proteins (80 kDa) und die Banden der Untereinheiten (45 kDa) in einer Gelspur berücksichtigt. Mit zunehmender Ammoniumchlorid-Konzentration erfolgt ein signifikanter Anstieg der apikalen Sekretion von gp80, bei gleichzeitiger Verringerung der basolateralen Sekretion (Abb. 4.25 A, B). Bei einer Ammoniumchlorid-Konzentration von 20 mM steigt die apikal sezernierte Menge von gp80 im Vergleich zu den Kontrollzellen um $20 \pm 3 \%$ und bei 50 mM um $23 \pm 1 \%$. Die basolateral sezernierte Menge ist um den jeweiligen Wert erniedrigt.

Durch die zusätzliche Behandlung mit 50 mM Lactose kann die apikal sekretierte Menge an gp80 bei den 50 mM Ammoniumchlorid behandelten Zellen auf $30 \pm 5 \%$ gesteigert werden (Abb. 4.25 C, D). Die mit 20 mM NH_4Cl behandelten Zellen zeigen nach einer Behandlung mit Lactose keine zusätzliche Veränderung. Die Kontrollzellen sind lediglich mit 50 mM Lactose behandelt. Im Vergleich zu Kontrollzellen ohne Lactose Behandlung (Abb. 4.25 A, B) ist hier ebenfalls kein Effekt zu beobachten.

Diese Daten zeigen, dass es durch eine Neutralisation des endosomalen pH-Wertes zu einer Veränderung des apikal und basolateral sezernierten Anteils an gp80 kommt.

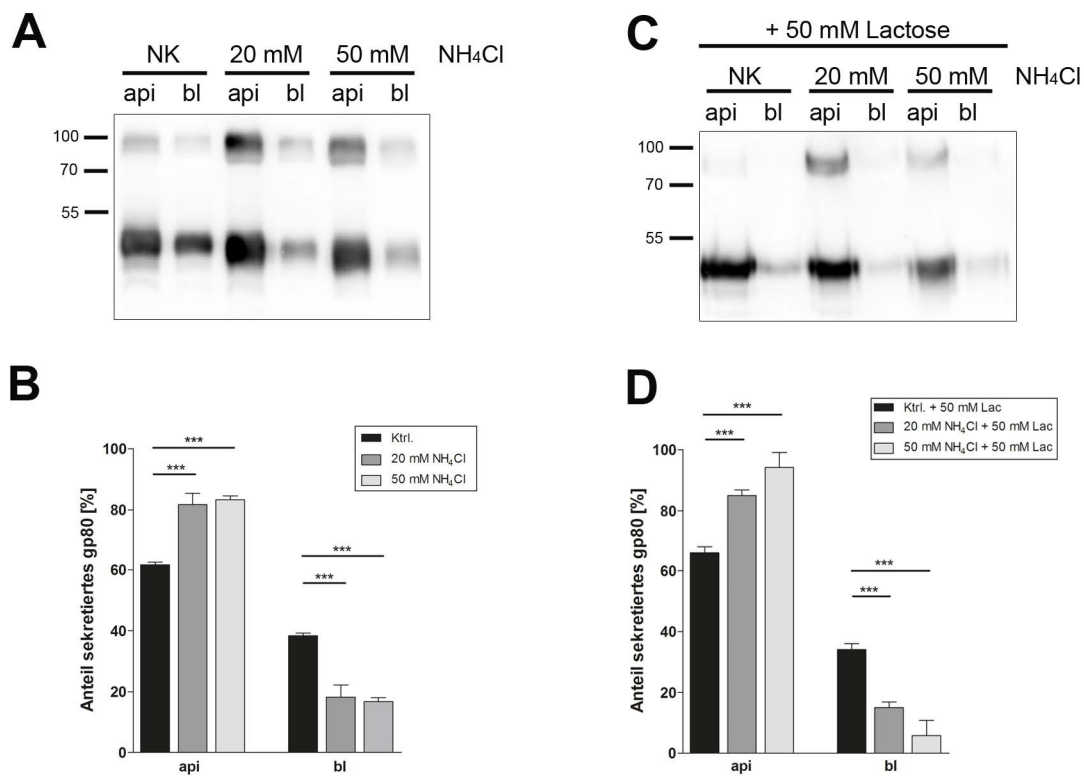


Abb. 4.25 Die Menge an apikal sezerniertem gp80 wird durch den endosomalen pH beeinflusst

(A und C) Sechs Tage alte, auf PET- Filtern kultivierte MDCK_{p75GFP} Zellen wurden über Nacht mit 20 mM und 50 mM Ammoniumchlorid (A) sowie zusätzlich mit 50 mM Lactose (C) in Vollmedium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit den gleichen NH₄Cl bzw. Lactose Konzentrationen in FKS und Phenolrot freiem Medium für 2 h. Das apikale und basolaterale Medium wurde gesammelt, mit Amicon Zentrifugenfiltern ankonzentriert und mittels Immunoblot auf die Menge an sezerniertem gp80 untersucht. Mit Hilfe von anti gp80 Antikörper lassen sich die glykosylierte 80 kDa große Form und die 45 kDa große Untereinheit detektieren. (B und D) Quantifizierung vier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni Post-test (**p < 0,001). Ktrl.: Kontrollzellen; Lac: Lactose; api: apikal; bl: basolateral

In einer weiteren Auswertung dieses Experimentes ist der Einfluss von Ammoniumchlorid \pm Lactose auf die insgesamt von der Zelle sekretierte Menge an gp80 dargestellt (Abb. 4.26 A). Normalisiert man die relative Menge an

sezerniertem gp80 auf die durch die jeweiligen Kontrollzellen sekretierte Menge, zeigt sich bei einer Behandlung mit 20 mM Ammoniumchlorid kein deutlicher Unterschied zu den Kontrollzellen. Bei 50 mM Ammoniumchlorid sinkt die allgemein sekretierte Menge an gp80 um $14 \pm 22 \%$. In den Lactose behandelten Zellen (Abb. 4.26 B) zeigt sich ebenfalls kein deutlicher Unterschied der 20 mM NH_4Cl behandelten Zellen zu den Kontrollzellen. Allerdings ist hier die Menge an sezerniertem gp80 bei 50 mM NH_4Cl um etwa $30 \pm 14 \%$ niedriger.

Diese Beobachtungen zeigen, dass der pH-Wert Einfluss auf die generelle Menge an sekretiertem gp80 Protein sowie auf dessen Sortierung hat.

Die allgemeine Sekretionsmenge sinkt mit steigender Ammoniumchlorid-Konzentration und wird verstärkt apikal sezerniert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sekretion von gp80 einer feinen pH-Wert Abstimmung unterliegt und zusätzlich durch Lactose beeinflussbar ist.

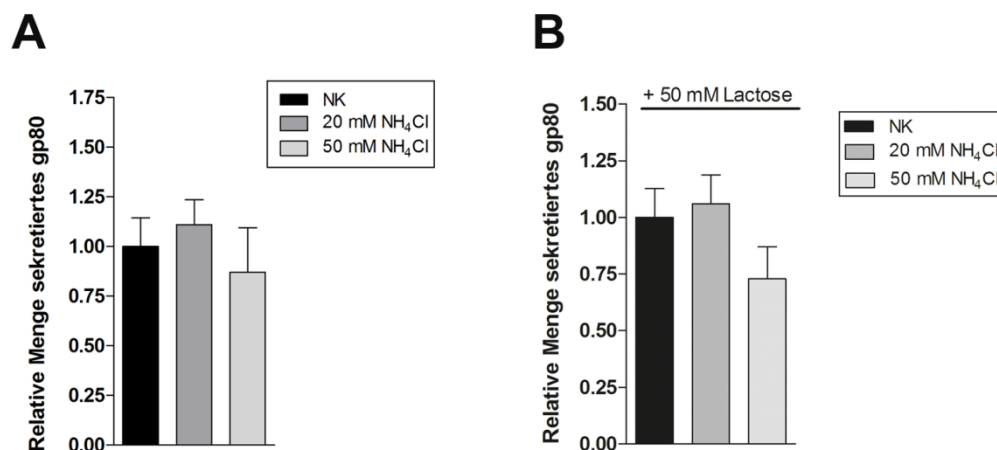


Abb. 4.26 Die relative Menge an sekretiertem gp80 wird erst durch 50 mM NH_4Cl mit 50 mM Lactose merklich beeinflusst

(A) Quantifizierung der relativ sekretierten Menge an gp80 unter Einfluss von 20 und 50 mM Ammoniumchlorid, gewonnen aus den Daten aus Abb. 3.25 (B) Quantifizierung der relativ sezernierten gp80-Menge unter Einfluss von 20 und 50 mM Ammoniumchlorid und 50 mM Lactose. Dargestellt sind immer die Mittelwerte \pm Standardfehler.

Neben der Sekretion von gp80 wurde auch die Oberflächenexpression des Neurotrophinrezeptors p75, in diesem Fall mit GFP fusioniert, analysiert. Abb. 4.27 A und B zeigen die Western Blots von 20 mM und 50 mM NH_4Cl behandelten MDCK_{p75GFP} Zellen in An- und Abwesenheit von 50 mM Lactose. Zusätzlich zum apikalen Markerprotein p75 sollte der Transport eines basolateralen Proteins untersucht werden. Hierfür wurde CD29, ein Bestandteil des Integrinkomplexes, ausgewählt. Die vermehrte basolaterale Lokalisation des Proteins deckt sich mit den bisherigen Berichten in der Literatur (Gut *et al.*, 1998). Diese Verteilung wird durch die Behandlung mit Ammoniumchlorid und/oder Lactose nicht beeinflusst (Abb. 4.27 A, B, D). Für p75-GFP ist die bereits beschriebene typische apikale Verteilung zu beobachten. Durch Behandlung der Zellen mit 20 mM Ammoniumchlorid ist kein signifikanter Unterschied in der Oberflächenexpression von p75-GFP im Vergleich zu den Kontrollzellen zu beobachten. Die Behandlung mit 50 mM NH_4Cl weist nur eine geringe signifikante Steigerung der apikalen Sortierung des Proteins auf (Abb. 4.27 A, C). Durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit 50 mM Lactose kommt es mit zunehmender NH_4Cl Konzentration zu einer signifikanten Verschiebung der apikalen Sortierung von p75-GFP zur basolateralen Seite (Abb. 4.27 B, C). Die alleinige Behandlung mit Lactose hingegen zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Sortierung des Membranproteins.

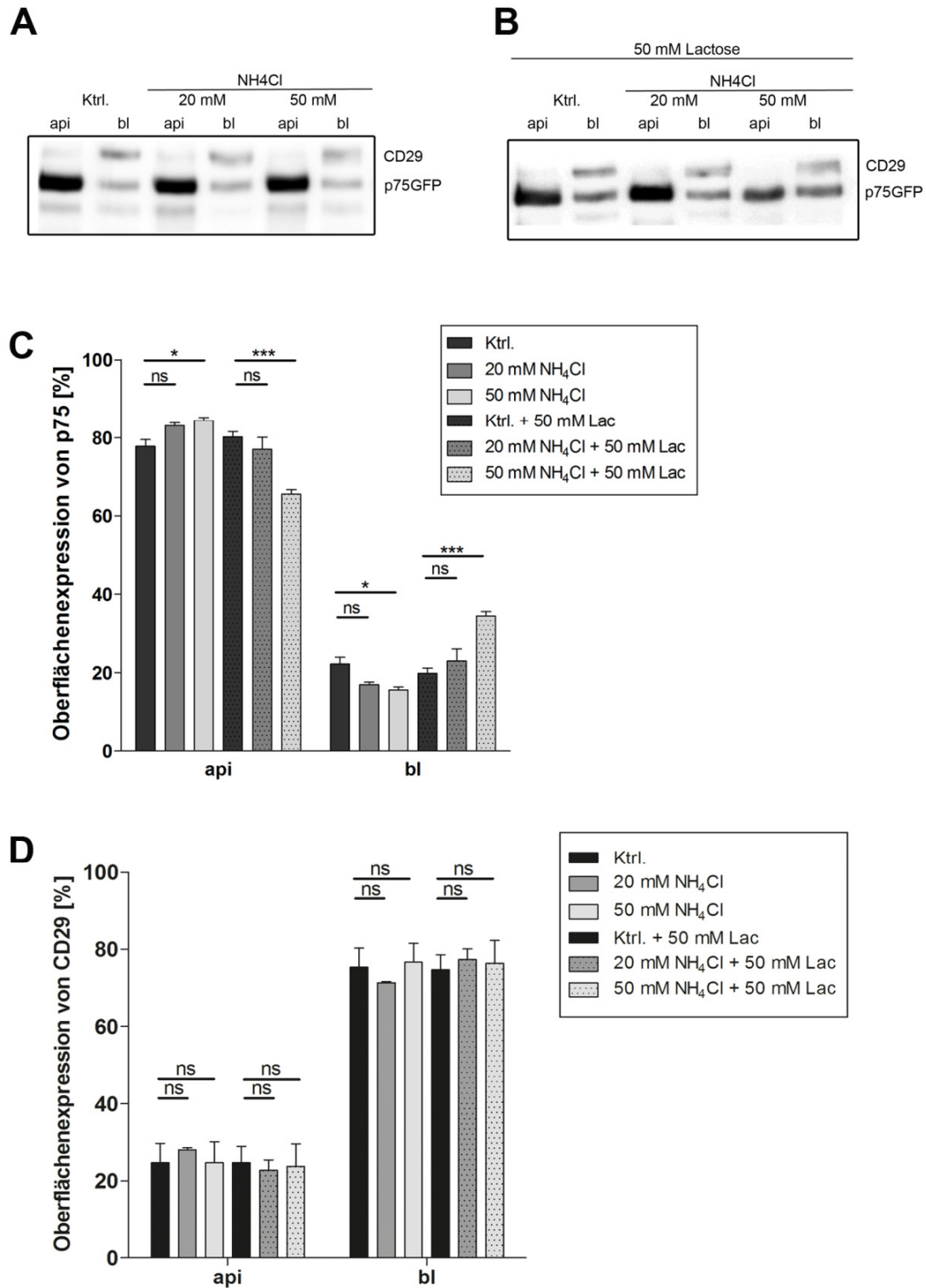


Abb. 4.27 Oberflächenexpression von p75GFP und CD29 nach endosomaler Neutralisation und Lactosebehandlung (Legende siehe nächste Seite)

Abb. 4.27 Oberflächenexpression von p75GFP und CD29 nach endosomaler Neutralisation und Lactosebehandlung

MDCKp75GFP Zellen wurden auf PET-Filtern kultiviert und mit 20 mM und 50 mM in An- und Abwesenheit von 50 mM Lactose inkubiert. Die Menge an p75-GFP und CD29 an der apikalen und basolateralen Zellmembran wurde mittels Oberflächenbiotinylierung gefolgt von SDS-PAGE und Western Blot analysiert. p75-GFP wurde mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers detektiert und CD29 mittels eines anti-CD29-Antikörpers nachgewiesen. **(A und B)** Western Blots der apikalen und basolateralen Verteilung von p75-GFP und CD29. **(C)** Quantifizierung der Oberflächenexpression von p75-GFP und **(D)** CD29 von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer zweifaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von einem Bonferroni Post-test (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Ligandenbindung und Komplexbildung von Galectin-3

Galectin-3 passiert innerhalb der Zelle verschiedene Kompartimente mit spezifischen pH-Werten. In diesen Kompartimenten geht das Protein als apikaler Sortierrezeptor eine Bindung zu seinem Liganden ein, wodurch es zu Bildung eines Galectin-3-Liganden Komplex kommt (Delacour *et al.*, 2007). Bei dieser Komplexbildung bildet Galectin-3 Oligomere, die durch die N-terminale Domäne des Lectins vermittelt werden (Ahmad *et al.*, 2004; Nieminen *et al.*, 2007). Bei dieser Oligomerisierung bleibt die C-terminale Kohlenhydraterkennungsdomäne jedoch frei. In neuesten Studien konnte eine C-terminal vermittelte Oligomerisierung von Galectin-3 unter Anwesenheit von multivalenten Liganden wie Asialofetuin beobachtet werden (Lepur *et al.*, 2012b). Ob und welchen Einfluss der sich verändernde pH-Wert während des apikalen Proteintransports auf die Ligandenbindung sowie die Komplexbildung von Galectin-3 hat, war bislang unbekannt.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse aus Fluoreszenz-polarisationsstudien wurden in Zusammenarbeit mit Tobias von Mach erstellt und sind auch Teil seiner Dissertation.

4.3.1 Die Bindung von Galectin-3 an Lactosylsepharose-Beads erfolgt unabhängig vom pH-Wert

Zunächst sollte die Bindung von Galectin-3 an als Ligand fungierende Lactosylsepharose-Beads bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 7,4; 6,5 und 5,9) untersucht werden. Dazu wurde rekombinantes humanes Galectin-3 und Trx-Galectin-3- Δ N hergestellt (siehe 3.6.1 *Herstellung von rekombinantem Galectin-3*). Bei Trx-Galectin-3- Δ N handelt es sich um ein Fusionsprotein bestehend aus der Kohlenhydratbindungsdomäne von Galectin-3 und Thioredoxin (bereitgestellt von H. Leffler, Lund, Schweden). Dieses Fusionsprotein besitzt somit keine N-terminale Domäne. Eine leere PD-10 Säule wurde mit 0,5 mL Lactosylsepharose-Beads gefüllt und diese anschließend mittels PBS pH 7,4; 6,5 und 5,9 equilibriert. Die rekombinanten Proteine wurden vorher mit Hilfe einer PD-10 Säule in PBS mit dem jeweiligen pH-Wert umgepuffert, jeweils 100 μ M wurden auf die Lactosylsepharose-Beads Säule gegeben und der Durchfluss gesammelt. Durchfluss und Auftrag wurden anschließend 1: 20 in PBS verdünnt und die Proteinkonzentration bei 280 nm bestimmt. Zusätzlich wurden Auftrag und Durchfluss mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Menge an rekombinantem Protein mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion beider Proteine wurde ein anti-Galectin-3 Antikörper verwendet. Sowohl Western Blots (Abb. 4.28 A) als auch Absorptionsmessungen (Abb. 4.28 B) zeigen keine Veränderung der gebundenen Galectin-3-Menge bei den unterschiedlichen pH-Werten. Dies trifft sowohl auf Galectin-3 als auch auf Trx-Galectin-3- Δ N zu.

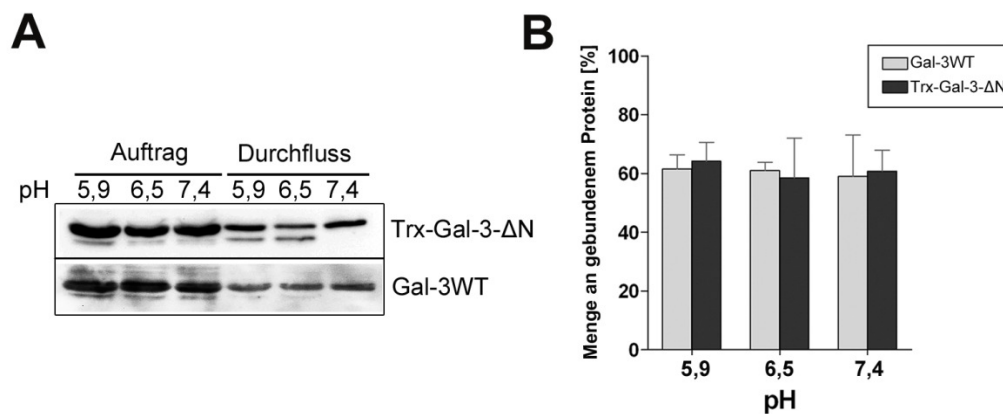


Abb. 4.28 pH-unabhängige Bindung von Galectin-3 an Lactosylsepharose-Beads

Gleiche Mengen an rekombinantem Galectin-3 (Gal-3WT) und Thioredoxin-fusionierter Galectin-3-Kohlenhydraterkennungsdomäne (Trx-Gal-3-ΔN) wurden bei unterschiedlichem pH-Werten auf eine Lactosylsepharose-Beadssäule gegeben. Auftrag und Durchfluss wurden gesammelt und die Menge an gebundenem Protein mittels Western Blot (**A**) oder Konzentrationsbestimmung bei 280 nm (**B**) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von drei separat durchgeführten Experimenten.

4.3.2 Die Bindung von Galectin-3 an 2`Fucosyllactose und A-Tetra erfolgt abhängig vom pH-Wert

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Galectin-3 an Lactosylsepharose-Beads pH-unabhängig ist.

In weiteren Experimenten sollte die Zuckerbindungsaffinität von Galectin-3 bei unterschiedlichem pH-Werten zu zwei weiteren Liganden mittels Fluoreszenzpolarisation untersucht werden (siehe 3.6.8 *Fluoreszenz-polarisation*). Als Liganden wurden 2`Fucosyllaktose (FucLac) (Abb. 4.29 A) und das Blutgruppenglykan A-Tetra (A-Tetra) (Abb. 4.29 B), jeweils gekoppelt an Fluorescein, verwendet. In einem pH Bereich von pH 4 - 8 wurden jeweils 0,1 μ M des Liganden eingesetzt und mit einer Konzentrationsreihe (0,1 - 10 oder 50 μ M) von rekombinantem Galectin-3 gemischt. Mit zunehmender Galectin-3 Konzentration steigen die Anisotropiekurven von A_0 bis zu einem maximalen Plateau (A_{\max}) an (Abb. 4.29). A_0 repräsentiert den freien Liganden und A_{\max} den Galectin-3-Liganden-Komplex. A_{\max} zeigt bei allen pH-Werten

vergleichbare Größen. Dies spricht für konstante Bedingungen, welche die Galectin-3 Affinität nicht beeinflussen. Im pH-Bereich von 6-8 ist die Affinität der Bindung bei beiden Liganden am höchsten (Abb.4.29). Bei einem niedrigeren pH verschiebt sich die Kurve in den rechten Bereich der x-Achse, was für eine niedrigere Bindungsaffinität spricht.

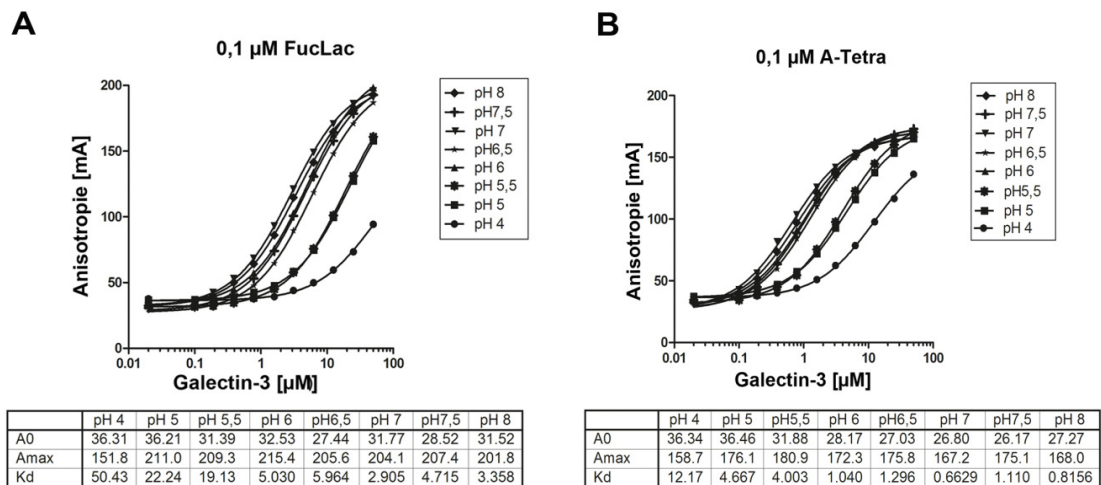


Abb. 4.29 pH-abhängige Bindungskurve von Galectin-3 mit FucLac und A-Tetra

0,1 µM FucLac und A-Tetra wurden mit einer Konzentrationsreihe (0,1 - 10 oder 50 µM) rekombinantem Galectin-3 gemischt und mittels Fluoreszenzpolarisation auf ihre Bindungsaffinität bei unterschiedlichem pH untersucht. **(A)** Anisotropiekurve mit FucLac **(B)** Anisotropiekurve mit A-Tetra. Es wurden jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die nicht-lineare Kurvenanpassung wurde mit GraphPad Prism durchgeführt.

4.3.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Oligomerisierung von Galectin-3

Galectin-3 besitzt die Eigenschaft mit Zuckerliganden zu großen Komplexen zu oligomerisieren (Ahmad *et al.*, 2004; Lepur *et al.*, 2012b). In weiteren Experimenten sollte die Komplexbildung von Galectin-3 mit dem Glykoprotein Asiolofetuin (ASF) in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht werden. Dieses besitzt neun verschiedene Bindungsstellen für Galectin-3. Dazu wurde rekombinantes Galectin-3 und das in 4.3.1 verwendete Fusionsprotein Thioredoxin-Galectin-3-ΔN (Trx-Gal-3-ΔN) aufgereinigt. 60 µM der rekombinanten Proteine wurden mit 20 µM ASF bei unterschiedlichen pH-

Werten gemischt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden Turbiditätsmessungen der gebildeten Komplexe, der individuellen rekombinanten Proteine und ASFs photometrisch bei 475 nm durchgeführt (Abb. 4.30 A).

Galectin-3 formt mit ASF Komplexe, was bereits durch eine mit dem bloßen Auge erkennbare Trübung der Lösung erkennbar ist (Abb. 4.30 A kleine Fotos). Diese Komplexbildung zeigt ihr Maximum bei pH 6,5. Trx-Gal-3-ΔN zeigt im Vergleich dazu in Anwesenheit von ASF eine nur sehr geringe Komplexbildung, was auf den Verlust des N-Terminus, der für die Selbstassoziation des Lectins zuständig ist, zurückzuführen sein könnte. Kontrollmessungen der rekombinanten Proteine sowie ASF alleine zeigen sehr geringe Messwerte nahe 0, was darauf schließen lässt, dass weder Galectin-3 noch ASF alleine eine Komplexbildung induzieren können.

In einem weiteren Versuch sollte eine mögliche Kopplung von Ligandenbindung und Oligomerisierung von Galectin-3 in einem kompetitiven Versuchsansatz analysiert werden. Dazu wurden 0,1 μM des Liganden FucLac gekoppelt an Fluorescein und 10 μM ASF als Inhibitor mit unterschiedlichen Galectin-3 Konzentrationen bei pH 7,5; 6,5 und 5,5 gemischt und mittels Fluoreszenzpolarisation untersucht (siehe 3.6.8 *Fluoreszenzpolarisation*). Abb. 3.30 B zeigt verschiedene Ansätze. Kreise repräsentieren die einzelnen Messwerte einer monovalenten Kinetik zwischen Galectin-3 [A] und FucLac [B]; die theoretisch errechnete Kurve dazu ist durch eine durchgezogene Linie repräsentiert. Quadrate zeigen eine multivalente Kinetik in zusätzlicher Anwesenheit von ASF [C]. Die theoretische multivalente Kurve ist in einer gepunkteten Linie dargestellt, während die gestrichelte Linie die theoretische Kurve der Kinetik von Galectin-3 und ASF jeweils für sich genommen zeigt.

Wie bereits in Abb. 4.29 gezeigt, sinkt die Bindungskapazität von Galectin-3 zu FucLac bei einem pH-Wert von 5,5 (Abb. 4.30 B, Kreise und durchgezogene Linie). Die Zugabe von ASF reduziert die Möglichkeit einer FucLac Bindung von Galectin-3, da ASF die essentielle Bindungsstelle blockiert. Die multivalente Kurve (Quadrate und gepunktete Linie) verschiebt sich daher auf der x-Achse nach rechts (Abb. 4.30 B, pH 7,5). Bei einem pH-Wert von 5,5 gleichen sich die

gemessenen Werte den theoretischen Kurven an. Die theoretischen Kurven zur monovalenten und multivalenten ASF Bindung weisen bei pH 7,5 allerdings eine steilere Steigung auf als die gemessene Kurve (Quadrate), was darauf hindeutet, dass weniger Galectin-3 Moleküle zur Ligandenbindung vorhanden sind als erwartet. Dies deutet auf eine Selbstassoziation des Lectins über seine C-terminale Domäne hin, wie sie auch an anderer Stelle bereits beobachtet wurde (Lepur *et al.*, 2012b). Diese Selbstassoziation scheint aufgrund der Annäherung der Kurven bei pH 6,5 und 5,5 ebenfalls pH-abhängig zu sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Oligomerisierung von Galectin-3 und die C-terminale Selbstassoziation des Lectins abhängig vom jeweiligen pH-Wert sind.

Abb. 4.30 pH-Wert abhängige Oligomerisierung und C-Terminus vermittelte Selbstassoziation von Galectin-3

(A) 60 μM rekombinantes Galectin-3 und Thioredoxin-Galectin-3C wurden mit 20 μM ASF bei unterschiedlichem pH gemischt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Komplexbildung wurde anschließend mit Hilfe einer Turbiditätsmessung bei 475 nm bestimmt. **(B)** 0,1 μM FucLac gekoppelt mit Fluorescein und 10 μM ASF, als Inhibitor wurden mit unterschiedlichen Galectin-3 Konzentrationen bei pH 7,5; 6,5 und 5,5 gemischt und anschließend mittels Fluoreszenzpolarisation untersucht. Dargestellt sind die Kinetiken unterschiedlicher Ansätze und deren theoretische Kurven (kontinuierliche, gestrichelte und gepunktete Linie). Kreise zeigen den Ansatz FucLac mit Galectin-3 (monovalent). Quadrate zeigen den gleichen Ansatz mit zusätzlich ASF (multivalent). Die Messungen wurden in einem dreifachen Ansatz durchgeführt.

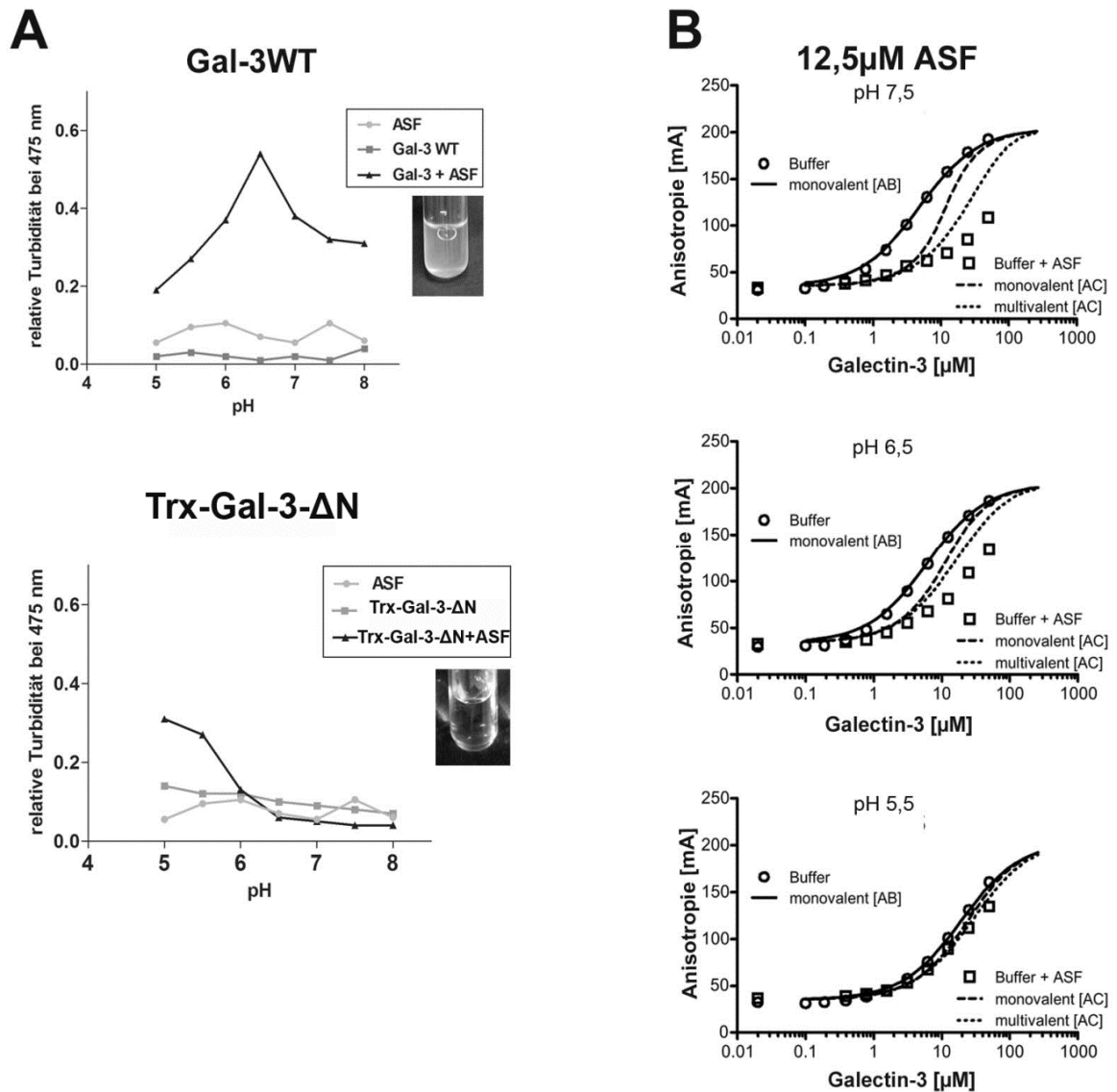


Abb. 4.30 pH-Wert abhängige Oligomerisierung und C-Terminus vermittelte Selbstassoziation von Galectin-3 (Legende siehe vorherige Seite)

5 Diskussion

5.1 Galectin-3 und das klarzellige Nierenzellkarzinom

Galectin-3 ist das am häufigsten in der Niere exprimierte Lectin und ist an vielen unterschiedlichen Funktionen wie der Zellentwicklung, -differenzierung, der Regulation der Apoptose, dem Proteintransport und der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktion beteiligt (Liu und Rabinovich, 2005; Merseburger *et al.*, 2008a). Im Hinblick auf diese Funktionen wird eine Beteiligung des Proteins an der Entwicklung von klarzelligen Nierenzellkarzinomen vermutet, was mit einer Inzidenz von 75 % eines der häufigsten malignen Tumore der Niere ist. Bisherige Untersuchungen zeigten sehr heterogene Ergebnisse zur Expression von Galectin-3 in diesem Tumor (Francois *et al.*, 1999; Merseburger *et al.*, 2008a; Sakaki *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2001). In diesem Teil der Arbeit wurde die Lokalisation und die Expression von Galectin-3 mit apikalen und basolateralen Markerproteinen in der normalen Niere und dem klarzelligen Nierenzellkarzinom mittels KLSM und Western-Blotanalysen genauer untersucht. Desweiteren wurden mittels einer Galectin-3 Affinitätssäule Bindepartner des Lectins identifiziert. Mit diesen Untersuchungen sollten tiefere Erkenntnisse darüber erlangt werden, wie Galectin-3 in der Tumorprogression des klarzelligen Nierenzellkarzinoms involviert ist.

5.1.1 Das klarzellige Nierenzellkarzinom

Von den 101 untersuchten Patienten mit Nierenzellkarzinomen wiesen 75 % ein klarzelliges Nierenzellkarzinom (clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)) auf, was bestätigt, dass es das am häufigsten vorkommende Nierenzellkarzinom ist (Abb. 4.1). Insgesamt wurden 68 Patienten für die Studie ausgewählt. Die histopathologischen Untersuchungen zeigten, dass der größte Anteil der klarzelligen Nierenzellkarzinome mäßig differenziert war (G2). Die Zahl der männlichen und weiblichen Patienten betrug jeweils etwa 50 %, was nicht den

Angaben der Literatur entspricht. Bei etwa $\frac{1}{4}$ der Patienten tauchten Fernmetastasen auf (Tabelle 4.1). Diese sind bekanntlich für eine schlechtere Prognose mit geringerer Überlebensrate verantwortlich (Ito *et al.*, 2009). Da in dieser Studie der weitere Verlauf der Patienten nach der Nephrektomie nicht beobachtet wurde, können darüber keine Aussagen getroffen werden. Bei weiteren histologischen Untersuchungen der HE- und Azanfärbungen konnten die charakteristischen Eigenschaften des gesunden Nierengewebes und des Tumorgewebes bestätigt werden (Abb. 4.2). Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.3) zeigten Charakteristika der gesunden Nierenepithelzellen und der Tumorzellen. Dabei ist die große Anzahl Lipidtropfen, der reiche Glykogengehalt und die geringere Anzahl an Mitochondrien in den Tumorzellen im Vergleich zum gesunden Nierengewebe, wie es in Mackay *et al.* bereits beschreiben wurde, auffällig (Mackay *et al.*, 1987). Anhand der Anzahl und der Morphologie der Mitochondrien lassen sich verschiedene Typen der Nierenzellkarzinome voneinander unterscheiden (Erlandson *et al.*, 1997).

5.1.2 Lokalisation und Expression apikaler und basolateraler Markerproteine in der Niere und dem klarzelligen Nierenzellkarzinom

Villin ist ein Aktin-bindendes Protein, was hauptsächlich in den Mikrovilli des Bürstensaums von Darm und Niere auskleidenden Epithelzellen exprimiert wird (Bretscher und Weber, 1980). Es galt lange als Tumormarker für gastrointestinale Karzinome, hepatozelluläre Karzinome und Nierenzellkarzinome (Bacchi und Gown, 1991). Bisherige immunhistologische Untersuchungen konnten zeigen, dass Villin im proximalen Tubulus der gesunden Niere lokalisiert ist und im Nierenzellkarzinom mit zunehmender Differenzierung abnimmt (Grone *et al.*, 1986). Die Expression von Villin im Bürstensaum der Epithelzellen des proximalen Tubulus und die Reduktion des Proteins in klarzelligen Nierenzellkarzinomen konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der immunhistologischen Untersuchungen und der Western-Blotanalysen

bestätigt werden (Abb. 4.4 C, D und Abb. 4.5 B, C). Auch die Normalisierung auf α -Tubulin zeigte eine Reduktion des apikalen Markerproteins (Abb. 4.6 B). E-Cadherin zählt in Epithelzellen zu den wichtigsten Zell-Adhäsionsmolekülen indem es Zell-Zell-Kontakte wie die *Zonula adherens* vermittelt und somit die Zellpolarität aufrecht erhält (Mays *et al.*, 1995; Petruzzelli *et al.*, 1999). In der humanen adulten Niere ist E-Cadherin ausschließlich basolateral in Epithelzellen des distalen Tubulus und des Sammelrohres lokalisiert, während im proximalen Tubulus N-Cadherin, ein weiterer Cadherin-Vertreter, vorherrscht (Keller *et al.*, 2012; Nouwen *et al.*, 1993; Tani *et al.*, 1995). In bisherigen histologischen Untersuchungen an klarzelligen Nierenzellkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die Expression von E-Cadherin mit zunehmender Differenzierung des Tumors verloren geht (Katagiri *et al.*, 1995; Mareel *et al.*, 1992). Mit dem Verlust von E-Cadherin und dem damit einhergehenden Verlust der interzellulären Adhäsion erfolgt die Ablösung der Tumorzellen vom Primärtumor. Diese können nun umliegendes Gewebe infiltrieren und Metastasen bilden. Behrens und Kollegen konnten bereits an MDCK Zellen invasive Eigenschaften beobachten, sobald die Zell-Zell-Adhäsion durch einen anti-E-Cadherin Antikörper inhibiert wurde (Behrens *et al.*, 1985). Die genaue Ursache des Expressionsverlusts ist noch Gegenstand aktueller Forschung, sowie der Einsatz von E-Cadherin als Tumorsuppressor in der Tumorthherapie. In der vorliegenden Arbeit kann die basolaterale Lokalisation von E-Cadherin im distalen Tubulus und im Sammelrohr sowie eine signifikante Reduktion des Proteins in klarzelligen Nierenzellkarzinomen mit Hilfe der KLSM-Aufnahmen und der biochemischen Analysen bestätigt werden (Abb. 4.4 E, F; Abb. 4.5 B, C und Abb. 4.6 B).

β -Catenin ist eine Komponente der *Zonula adherens* und der Desmosomen und zeichnet sich durch die Assoziation mit dem Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin aus (Kemler, 1993; Piepenhagen und Nelson, 1993). In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit konnte die basolaterale Lokalisation des Proteins bestätigt werden (Abb. 4.4 G). Ein Verlust von β -Catenin im Bereich der *Zonula adherens* geht mit dem Abbau der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion einher und fördert die

Metastasierung von Nierenzellkarzinomen (Behrens *et al.*, 1993; Katagiri *et al.*, 1995). Die hier dargestellten biochemischen Untersuchungen in klarzelligen Nierenzellkarzinomzellen können eine Regression der β -Catenin-Expression bestätigen (Abb. 4.4 H, Abb. 4.6 A).

Aquaporin- 2 (AQP-2) fungierte in dieser Arbeit neben Villin als zweites apikales Markerprotein. Es handelt sich um ein durch Antidiuretisches Hormon (ADH) reguliertes Membranprotein, welches für die Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes zuständig ist. In der Niere wird es ausschließlich in den Hauptzellen des Sammelrohres synthetisiert. Nach Aktivierung durch ADH wird es an die apikale Zellmembran transportiert und induziert dort den Wasserein- und -ausstrom. Anschließend wird es über frühe Endosomen in Rab-11 positiven Vesikeln gelagert (zusammengefasst in (Takata *et al.*, 2008)). In der vorliegenden Arbeit konnte die Lokalisation in subapikalen vesikulären Strukturen im Sammelrohr bestätigt werden (Abb. 4.4 A). Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, wie auch bei allen anderen verwendeten Markerproteinen, eine Reduktion der AQP-2 Expression in den Tumorzellen (Abb. 4.4 B).

Die stark reduzierte Expression aller in dieser Studie verwendeten Markerproteine im klarzelligen Nierenzellkarzinom lässt sich durch eine Depolarisation der Tumorzellen erklären. Ein deutlicher Verlust der Zellpolarität lässt sich auch anhand der Lokalisations- und Expressionsuntersuchung von E-Cadherin und Villin im Zellkulturmodell zeigen (Abb. 4.7). Sowohl die RC-124 als auch die RCC-FG1 Zellen bilden selbst nach sieben Tagen keine Polarität aus, was an der diffusen Verteilung von E-Cadherin und Villin zu erkennen ist (Abb. 4.7). Zusätzlich bestätigen die Western-Blotanalysen zur Expression von E-Cadherin, die bereits aus den Patientenproben gewonnenen Daten eines Expressionsrückgangs (Abb. 4.8). Anhand dieser nicht ausgeprägten Polarität bei den RC-124 Zellen eignen sie sich nur bedingt für Lokalisationsstudien.

5.1.3 Lokalisation und Expression von Galectin-3 im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Die Expression von Galectin-3 variiert in Tumorgewebe abhängig von der Tumorart und der Differenzierung des Gewebes und ist nach bisherigen Untersuchungen sehr heterogen (Danguy *et al.*, 2002; Liu und Rabinovich, 2005; Oka *et al.*, 2004; van den Brule *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2001). Ein Anstieg der Galectin-3 Expression konnte bereits in einer RT-PCR basierenden Studie von 66 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom (Sakaki *et al.*, 2010) und einer cDNA Microarray Analyse von 4 Patienten mit ccRCC gezeigt werden (Young *et al.*, 2001). Auf der anderen Seite konnte auch ein Verlust der Galectin-3 Expression während der Tumorgenese in einer Untersuchung von 149 Patienten mit Nierenzellkarzinom beschrieben werden (Merseburger *et al.*, 2008a). Andere immunohistochemische Studien von 74 (Francois *et al.*, 1999) und 137 (Dancer *et al.*, 2010) Patienten mit ccRCCs zeigten ein heterogenes Expressionsbild von Galectin-3. Oft wurde die Expression in diesen Untersuchungen nur mit Hilfe einer Methode vorgenommen und die ausgesuchten Patientenkohorten waren sehr unterschiedlich. In der vorliegenden Arbeit stützen sich die Ergebnisse auf fluoreszenzmikroskopische Analysen und Western-Blots von Gewebeproben aus Patienten mit ausschließlich klarzelligem Nierenzellkarzinom. Trotz der geringen Anzahl von 39 Patienten, konnte in 79 % der untersuchten Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom eine signifikante Überexpression von Galectin-3 in den Tumorzellen festgestellt werden (Abb.4.5, 4.6), die sich sogar in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen durch eine starke Färbung von Galectin-3 bestätigen ließ (Abb. 4.4). Desweiteren deutet auch die starke Expression des Lectins in RCC-FG1 Zellen auf eine Beteiligung von Galectin-3 an der Tumorprogression und der zellulären Differenzierung hin (Abb. 4.8).

In Prostatakarzinomzellen sinkt die Expression von Galectin-3 mit zunehmender Tumordifferenzierung und korreliert mit einer kürzeren Überlebensrate der Patienten (Merseburger *et al.*, 2008b). Demzufolge wird Galectin-3 hier sogar als Tumorsuppressor bezeichnet. Dagegen wird das Überleben von Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen von einem niedrigen Galectin-3-Gehalt

begünstigt (Francois *et al.*, 1999). Bei der Untersuchung des Galectin-3 Levels im Urin von Patienten mit unterschiedlichen Tumorarten konnte gezeigt werden, dass der Gehalt des Lectins im Urin bei Patienten mit Metastasen signifikant erhöht war im Vergleich zu Patienten mit alleinigem Primärtumor (Balasubramanian *et al.*, 2009). Somit stellt Galectin-3 einen potentiellen Marker für den Differenzierungsgrad dar. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Korrelation der Tumoraggressivität mit der Galectin-3 Expression festgestellt werden. Sowohl Patienten mit einem guten Differenzierungsgrad (G1) als auch Patienten mit mäßig differenziertem (G3) klarzelligen Nierenzellkarzinom wiesen eine erhöhte Galectin-3 Expression auf (Tabelle 4.2). Allerdings zeigte keiner der Patienten mit einer erniedrigten Galectin-3-Expression Metastasen. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass es eine Korrelation zwischen der Galectin-3 Expression und der Tumormalignität gibt, was bereits bei der Entstehung von Magen- und Pankreaskrebs gezeigt werden konnte (Kim *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2011).

Viele verschiedene Studien konnten Galectin-3 eine Beteiligung bei der Metastasierung zuschreiben. Der erste Schritt bei der Metastasierung ist das Ablösen von einzelnen Tumorzellen vom Primärtumor. Diesen Schritt unterstützt Galectin-3 in Brust- und Prostatakrebs, indem es an Zelladhäsionsmoleküle bindet und dadurch Zell-Zell- und Zell-Matrixverbindungen auflöst (Glinsky *et al.*, 2003). Eine Galectin-3 Überexpression in Brust- und Lungenkrebs ging mit erhöhter Invasion der Tumorzellen einher (O'Driscoll *et al.*, 2002; Warfield *et al.*, 1997). Gleichzeitig führt eine verminderte Galectin-3 Expression in Enddarmkrebs zu einer verringerten Zellmotilität (Hittelet *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang konnte eine Interaktion von Galectin-3 mit β -Catenin nachgewiesen werden (Kobayashi *et al.*, 2011; Shimura *et al.*, 2005; Shimura *et al.*, 2004). Beispielsweise reguliert Galectin-3 in der Brustkrebszelllinie BT549 den Wnt/ β -Catenin Signalweg durch Bindung an β -Catenin (Shimura *et al.*, 2004). In Enddarmkrebszellen nimmt Galectin-3 ebenfalls Einfluss auf den Wnt-Signalweg indem es die Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) reguliert. Dadurch wird die Phosphorylierung und Degradation von β -Catenin beeinflusst

und es kommt zur Akkumulation von β -Catenin im Zellkern (Song *et al.*, 2009). Dies steigert die Tumorzellprogression. In Pancreastumorzellen konnte stattdessen festgestellt werden, dass ein *knock down* von Galectin-3 zu einer verminderten Zellmigration und -invasion führt, verursacht durch eine erniedrigte Expression von β -Catenin, GSK-3 β und Akt (Kobayashi *et al.*, 2011). Anhand der verminderten Expression von β -Catenin in der vorliegenden Studie (Abb. 4.4 und 4.6) und in anderen Untersuchungen, nimmt Galectin-3 vermutlich auch auf den Wnt-Signalweg in klarzelligen Nierenzellkarzinomen Einfluss (Shimazui *et al.*, 1997). Einen weiteren Beweis dafür lieferten CoIP Analysen mit 16 der hier untersuchten Patienten. Anhand dessen konnte eine gesteigerte Interaktion von Galectin-3 mit β -Catenin im Tumor festgestellt werden, während diese im Vergleich zum Normalgewebe unterhalb der Messgrenze liegt (Greb, 2011).

Galectin-3 erhöht die Motilität von Krebszellen nicht nur durch die Interaktion mit β -Catenin. Beispielsweise konnte in Magenkrebszellen festgestellt werden, dass Galectin-3 die Expression von Fascin-1, einem Aktinbündelungsprotein, erhöht und damit die Neugestaltung des Zytoskeletts bewirkt (Kim *et al.*, 2010). Desweiteren vermittelt Galectin-3 auch weiterführende Schritte der Metastasierung, wie die Zell-Zell-Adhäsion zwischen Tumorzellen, die Zellmatrix-Interaktionen um an gesundem Gewebe anzudocken und die Anlagerung an Endothelzellen zur Förderung der Angiogenese (Glinsky *et al.*, 2003; Hood und Cheresch, 2002; Inohara und Raz, 1995; Khaldoyanidi *et al.*, 2003).

Im Rahmen der Erforschung des Expressionsverhaltens von Galectin-3 wurde in dieser Arbeit die Tauglichkeit von α -Tubulin und GAPDH als Referenzproteine getestet (Abb. 4.6). In Übereinstimmung mit vorherigen Studien konnte eine Zunahme der GAPDH-Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomzellen festgestellt werden (Vila *et al.*, 2000). α -Tubulin zeigte dahingegen im Tumor keine Veränderung in der Expression im Vergleich zum gesunden Nierengewebe und eignet sich somit als Referenzprotein (Abb. 4.6 A). Die Normalisierung der densitometrischen Daten von Galectin-3, Villin und

E-Cadherin auf α -Tubulin zeigten keine Veränderung der jeweiligen Expressionsverhalten zu den in Abb. 4.5 dargestellten Daten (Abb. 4.6 B).

Bei der Untersuchung der Lokalisation von Galectin-3 im gesunden Nierengewebe und im klarzelligen Nierenzellkarzinom konnte eine mosaikartige Lokalisation im distalen Tubulus und im Sammelrohr festgestellt werden (Abb. 4.4). In Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen können diese Lectin-exprimierenden Zellen im Sammelrohr als Schaltzellen identifiziert werden (Winyard *et al.*, 1997). Dies zeigt sich auch an der verminderten Lokalisation von Galectin-3 in AQP-2 positiven Hauptzellen (Abb. 4.4 A). Eine zusätzliche immunzytochemische Identifikation der Schaltzellen könnte mittels der H⁺-ATPase als Marker erfolgen.

Die Galectin-3 Expression beschränkt sich auf einzelne Epithelzellen des distalen Tubulus und des Sammelrohres (Abb. 4.4 A, C, E, G). Im Hinblick auf die Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms aus dem proximalen Tubulus (Thoenes *et al.*, 1990) impliziert dies einen drastischen Anstieg der Galectin-3-Synthese in Epithelzellen des proximalen Tubulus während der Tumorgenese. Diese Möglichkeit konnte bereits für das Wilms-Tumorsuppressorgen bestätigt werden (Campbell *et al.*, 1998). Es wird ebenfalls erst im klarzelligen Nierenzellkarzinom exprimiert. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das klarzellige Nierenzellkarzinom seinen Ursprung auch im distalen Tubulus oder im Sammelrohr hat (Tani *et al.*, 1995). Diese Variationen im zellulären Ursprung des Tumors würden auch die unterschiedlichen Expressionsmuster von Galectin-3 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen erklären. Aufgrund der mosaikartigen Expression von Galectin-3 stellt sich die Frage, warum das Lectin nicht im proximalen Tubulus detektiert werden konnte. Basierend auf vorherigen Studien konnte Galectin-3 als apikaler Sortierrezeptor von *lipid raft* unabhängigen Proteinen identifiziert werden und trägt somit zum Erhalt der Zellpolarität bei (Delacour *et al.*, 2006). Aufgrund des großen Repertoires an Galectinen in der Niere (Poland *et al.*, 2011), könnte auch ein anderer Vertreter der Galectin Familie diese Aufgabe in den Epithelzellen des proximalen Tubulus übernehmen. In zukünftigen Untersuchungen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie könnte dies geklärt

werden. Man könnte allerdings auch vermuten, dass ein Transport von nicht-raft Proteinen in diesen Zellen geringer ist und im distalen Tubulus vorherrscht. Um diese Frage zu klären, wäre eine genauere Untersuchung des Proteintransportes im distalen Tubulus nötig.

5.1.4 Nukleäre Akkumulation von Galectin-3

Im Rahmen der Lokalisationsstudien von Galectin-3 wurde auch die zelluläre Verteilung näher untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Anstieg der Galectin-3 Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen von einer Erhöhung des Galectin-3 Gehalts im Nukleus begleitet ist (Abb. 4.9). Dies konnte anhand von xz-Stapelaufnahmen mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop mit anschließender 3D-Rekonstruktion und Erstellung eines Intensitätsprofils veranschaulicht werden (Abb. 4.9 A, B). Diese Beobachtungen konnten zusätzlich durch eine Kernisolationsstudie gefolgt von einer Western-Blotanalyse bestätigt werden (Abb. 4.9 C, D, E) und deuten auf eine Veränderung im Import-/Export-Mechanismus von Galectin-3 hin. Die intrazelluläre Lokalisation von Galectin-3 ist vom Zelltyp und vom Proliferationsstatus der Zelle abhängig (Haudek *et al.*, 2010). Es befindet sich entweder ausschließlich im Zytoplasma, im Nukleus oder ist zwischen beiden Kompartimenten gleichmäßig verteilt (Gaudin *et al.*, 2000; Moutsatsos *et al.*, 1987; Openo *et al.*, 2000). Im Zellkern kann es diffus im Nukleoplasma vorliegen aber auch mit Interchromatin oder *Cajal bodies* assoziiert sein (Matera, 1999; Spector, 2001). Die Lokalisation des Lectins ist allerdings nicht statisch sondern intrazelluläres Galectin-3 pendelt zwischen Nukleus und Zytosol (Davidson *et al.*, 2002). Da Galectin-3 kein Kernlokalisierungssignal besitzt (Gorlich und Mattaj, 1996; Pante und Aebi, 1996), ist bis jetzt immer noch unklar wie es in den Zellkern gelangt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es über passive Diffusion oder mit Hilfe des Importin α/β Komplex in den Zellkern gelangt (Nakahara *et al.*, 2006; Nakahara und Raz, 2007). Dem gegenüber konnte auch gezeigt werden, dass ein Teil der N-Terminalen Sequenz von Galectin-3 den Eintritt induziert (Davidson *et al.*, 2006; Gaudin *et*

al., 2000) und auch die Dimerisierung und Pentamerisierung des Lectins entscheidend dazu beitragen können (Ahmad *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 1998). Um mehr über diese Umverteilung des Lectins während der Tumorentstehung herauszufinden, könnten z.B. FRAP- (*Fluorescence recovery after Photobleaching*) Analysen durchgeführt werden. Nach Ausbleichen der Galectin-3 Fluoreszenz im Nukleus kann verfolgt werden, wie schnell die Rekrutierung aus dem Zytoplasma erfolgt.

Nach Translokation von Galectin-3 in den Zellkern kann dieses mit zahlreichen Proteinen und Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Gemin-4, Thyroid-spezifischer Transkriptionsfaktor (TTF-1) oder β -Catenin interagieren und nimmt somit Einfluss auf die Zellzyklusregulation, die Zellproliferation und die RNA-Prozessierung (Dumic *et al.*, 2006; Haudek *et al.*, 2010). Desweiterem wird nukleärem Galectin-3 eine pro-apoptotische Wirkung zugeschrieben (Califice *et al.*, 2004a; Fukumori *et al.*, 2006; Liu und Rabinovich, 2005). Im Hinblick auf die vorliegende Studie wird vermutet, dass Galectin-3 durch die induzierte Apoptose dem Tumor entgegenwirken möchte. Allerdings stellt sich die Frage, ob die vermehrte nukleäre Lokalisation des Lectins die Ursache oder eine Folge der Entstehung des Nierenzellkarzinoms ist. Diese Frage muss in zukünftigen Untersuchungen noch geklärt werden.

Die zelluläre Expression von Galectin-3 wird auch mit der malignen Tumorprogression in Verbindung gebracht. So konnten van den Brule und Kollegen in Prostatakarzinomzellen eine verminderte Galectin-3 Expression beobachten, die mit einem vermehrten Ausschluss des Lectins aus dem Zellkern einhergeht. Der hohe Anteil des damit einhergehenden zytoplasmatischen Galectin-3 Anteils fördert die Tumorprogression (van den Brule *et al.*, 2000). Diese Verlagerung der nukleären Lokalisation von Galectin-3 in das Zytoplasma während der Tumorprogression konnte auch in Zungenkrebs und Prostatakarzinomen ermittelt werden (Califice *et al.*, 2004a; Lotz *et al.*, 1993). Da in der vorliegenden Arbeit nur neun Patienten biochemisch auf die zelluläre Lokalisation von Galectin-3 untersucht wurden, ist in diesem Fall eine Aussage über den Zusammenhang der nukleären

Lokalisation und Progression des Tumors nicht möglich. Dies müsste in weiteren Studien mit einer höheren Patientenanzahl verifiziert werden.

5.1.5 Kolokalisation von Galectin-3 und Centrin-2 am Basalkörperchen des primären Ziliums

Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie und der Markierung des centrosomalen Markerproteins Centrin-2 konnte Galectin-3 am Basalkörperchen des primären Ziliums in humanen Nierenzellen nachgewiesen werden (Abb. 4.11). Diese Kolokalisationen sind am apikalen Zellpol von Epithelzellen des distalen Tubulus und des Sammelrohres aufzufinden (Abb. 4.11 A). Eine Kolokalisation von Galectin-3 mit Centrin-2 konnte bereits in MDCK-Zellen und Epithelzellen der Mausniere gezeigt werden (Chiu *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2010) und sogar hochauflösend dargestellt werden (Abb. 4.10 A). Das Lectin ist sehr dynamisch während der Zelldifferenzierung. Sobald die Zelle ihre Polarität erreicht hat assoziiert Galectin-3 mit centrosomalen Strukturen, wie Centrin-2 (Bornens, 2008; Koch *et al.*, 2010). Die Kolokalisationen in Zellen des klarzelliges Nierenzellkarzinoms sind dagegen signifikant reduziert (Abb. 4.11 B). Dies kann auf die verminderte Zellpolarisation und die damit einhergehende Deziliation der Zellen zurückgeführt werden (Fliegeauf *et al.*, 2007; Singla und Reiter, 2006). Durch fehlende Zilien, findet sich kein Centrin-2 mehr am apikalen Zellpol der Tumorzellen. Die zelluläre Lokalisation von Galectin-3 hat vermutlich erheblichen Einfluss auf die Deziliation und den Verlust der Zellpolarität. Galectin-3 spielt eine zentrale Rolle in der Ziliogenese des primären Ziliums und der Zellpolarisation. Voraussetzung dafür ist eine zytosolische Lokalisation des Lectins (Azimzadeh und Bornens, 2007; Chiu *et al.*, 2006), die in den Tumorzellen durch die vermehrte Translokation in den Nukleus nicht mehr gegeben ist.

In Studien an MDCK-Zellen und Mäusenieren führt eine Deletion des Lectins zur Veränderung der Anzahl, der Länge und der Struktur des primären Ziliums und der Centrosomen. (Koch *et al.*, 2010). Desweiteren beeinflusst dieser *knock down* auch die zelluläre Organisation von polaren Markerproteinen.

Zentrosomale Abnormalitäten und Defekte in der Galectin-3 Expression werden bereits in Verbindung gebracht mit der Entstehung zahlreicher Tumore (Califice *et al.*, 2004b; Fukasawa, 2005; Nigg, 2006). Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist im Gegensatz zum papillären Nierenzellkarzinom durch eine reduzierte Anzahl an primären Zilien charakterisiert (Schraml *et al.*, 2009). Die Degeneration der primären Zilien hängt dabei von der Inaktivierung des VHL Gens ab (Esteban *et al.*, 2006; Lutz und Burk, 2006). Mit dem Verlust des VHL-Gens geht die Stabilität der Mikrotubuli verloren. Es kommt zur Störung des intraflagellären Transports, wodurch das primäre Zilium abgebaut wird. Durch den Verlust der Zellpolarität kommt es zur Bildung von Nierenzellkarzinomen (zusammengefasst in (Mans *et al.*, 2008)). Im Fall des klarzelligen Nierenzellkarzinoms bleibt allerdings noch klärungsbedarf nach Ursache und Folge. Impliziert der Verlust der Assoziation von Galectin-3 mit Centrin-2 die Tumorentstehung oder ist es eine Konsequenz daraus?

Interessanterweise konnten Kolokalisationen von Galectin-3 und Centrin-2 in den RC-124 Zellen detektiert werden (Abb. 4.11 C) während in RCC-FG1 Zellen keine Kolokalisationen beobachtet werden konnten (Abb. 4.11 D). Dies unterstützt die Ergebnisse der Patienten. Im Hinblick auf die Untersuchungen in 4.1.6 zu den Polaritätsmarkern in RC-124 Zellen stellt sich nun die Frage, warum die Ausbildung eines Basalkörperchens erfolgt, wenn die Zellen keine Polarität ausbilden. Die Zellpolarität müsste in diesem Fall noch näher untersucht werden. Dabei könnten Fluoreszenzfärbungen von Mikrotubuli hilfreich sein, da sie eine entscheidende Rolle beim Aufbau des primären Ziliums bilden. Interessant wäre auch die Untersuchung der Proteine pVHL und Glykogen-Synthase-Kinase-3-beta (GSK-3-beta), die am Aufbau und der Stabilität von Mikrotubuli beteiligt sind und dadurch das primäre Zilium aufrecht erhalten. Vorherige Studien konnten bereits zeigen, dass bei einem Verlust beider Proteine die Ziliogenese gestört ist, während bei einem Verlust von pVHL, GSK-3-beta die Ziliogenese alleine aufrecht erhalten kann (Thoma *et al.*, 2007).

Im Hinblick auf die Beteiligung des primären Ziliums an verschiedenen Krankheiten und der Tumorentstehung ist es sehr wichtig die zellulären

Komponenten genauer zu verstehen, besonders die räumliche Anordnung und Interaktion dieser Strukturen. Mit Hilfe der GSDIM-Mikroskopie konnten zum ersten Mal detailreiche Abbildungen von Centrin-2 am Basalkörperchen des primären Ziliums unterhalb der Beugungsgrenze erstellt werden (Abb. 4.10 A). Das hochauflösende Mikroskopieverfahren verwendet die gleichen immunhistochemischen Verfahren wie bei der KLSM und kann laterale Auflösungen von bis zu 20 nm erzielen (Folling *et al.*, 2008). In weiteren Untersuchungen kann jetzt die Assoziation von Galectin-3 und Centrin-2 mit Hilfe des GSDIM-Verfahrens genauer analysiert werden. Zusätzlich sind mittlerweile dreidimensionale Aufnahmen möglich, mit einer axialen Auflösung von etwa 70 nm. Neben biochemischen Untersuchungen kann die hochauflösende Mikroskopie entscheidend dazu beitragen neue Erkenntnisse über zelluläre Ursachen von bisher unheilbaren Krankheiten zu gewinnen.

5.1.6 Korrelation der Expression von Galectin-3 mit CEACAM1

Die Untersuchung zur Expression von Galectin-3 und CEACAM1 zeigte eine Reduktion der CEACAM1-Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom im Vergleich zum gesunden Nierengewebe während die Galectin-3-Expression erhöht ist (Abb. 4.12 C, D). Von 54 untersuchten Patienten wiesen 73 % eine Erniedrigung der CEACAM1-Expression bei gleichzeitigem Anstieg der Galectin-3-Expression auf (Abb. 4.12 C). Daneben zeigten 11 % der Patienten eine Erniedrigung und 16 % eine Erhöhung beider Proteine im Tumorgewebe. Dies unterstreicht nochmals die Heterogenität von Patientenmaterial im Vergleich zum Zellkulturmodell. Trotz dieser Heterogenität zeigt die Mehrheit der Patienten die Reduktion von CEACAM1 bei gleichzeitiger Erhöhung von Galectin-3 im klarzelligen Nierenzellkarzinom. Das Zellkulturmodell unterstützt diese Aussage (Abb. 4.12 A). Somit kann eine Korrelation der Expression von CEACAM1 mit Galectin-3 während der Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms bestätigt werden.

CEACAM1 fungiert als homophiles und heterophiles Zell-Adhäsionsmolekül, auch für Tumorzellen (Benchimol *et al.*, 1989; Oikawa *et al.*, 1992). Ist die

Expression von CEACAM1 erniedrigt kommt es zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, auch zwischen Tumorzellen. Aufgrund dessen kommt CEACAM1 eine Rolle als Tumorsuppressor zu, was auch in Brust-, Prostata-, Enddarm-, Blasen- und Nierenkrebs bereits demonstriert werden konnte (Kammerer *et al.*, 2004; Neumaier *et al.*, 1993; Riethdorf *et al.*, 1997; Tilki *et al.*, 2010). In malignen Melanomzellen konnte wiederum eine *de novo* Expression von CEACAM1 festgestellt werden (Markel *et al.*, 2002; Sienel *et al.*, 2003; Thies *et al.*, 2002). Die Autoren vermuten, dass sich der Tumor damit gegen eine Immunantwort des Körpers schützen möchte, indem überschüssiges CEACAM1 natürliche Killerzellen inaktiviert. Die Rolle von CEACAM1 als Tumorsuppressor oder als Unterstützer der Tumorprogression hängt vom Gewebe ab aus dem der Tumor entsteht (Kammerer *et al.*, 2004). In der vorliegenden Studie könnte es demzufolge eine Rolle als Tumorsuppressor haben. In Brust- und Enddarmkrebs kommt CEACAM1 sogar eine proapoptotische Wirkung zu (Kirshner *et al.*, 2003; Nittka *et al.*, 2004). Interessanterweise ist die Reduktion von CEACAM1 in Prostatakarzinomen und Nierenzellkarzinomen von einer gesteigerten Expression des Proteins in Endothelzellen begleitet (Kammerer *et al.*, 2004; Kilic *et al.*, 2005). Somit schreibt man CEACAM1 auch eine proangiogene Wirkung zu. In der vorliegenden Untersuchung der klarzelligen Nierenzellkarzinome konnte keine vermehrte Expression von CEACAM1 in Endothelzellen im Tumorgewebe detektiert werden.

Bei der Unterteilung der Patienten in Gruppen mit hohem und niedrigem CEACAM1 Gehalt konnte eine Abhängigkeit des Expressionsverhaltens zum Differenzierungsgrad des Tumors festgestellt werden (Abb. 4.13). Mit zunehmendem Differenzierungsgrad steigt der Verlust von CEACAM1 im Tumorgewebe an. Gegenwärtig nimmt die Überexpression von Galectin-3 in diesem Gewebe mit zunehmendem Differenzierungsgrad ab. Da die Tumorzellen mit zunehmender Dedifferenzierung ihre Polarität verlieren ist auch von einem zunehmenden Verlust von CEACAM1 auszugehen. Dieser Verlust während der Tumorprogression konnte bereits in Brustkrebs mit der Prognose in Verbindung gebracht werden. Patienten mit niedrigem CEACAM1 Gehalt im

Tumorgewebe und einem höheren Differenzierungsgrad hatten eine schlechtere Prognose als Patienten mit erhöhtem CEACAM1 und niedrigem *Grading* (Wang *et al.*, 2011). Möglicherweise ist das Risiko der Metastasierung aufgrund der verlorenen Zell-Adhäsionseigenschaften hier höher. Bei einer weiteren Studie von Patienten mit Blasenkrebs konnte eine Abhängigkeit des CEACAM1 Gehalts im Urin mit dem *Staging* der Patienten festgestellt werden (Tilki *et al.*, 2010). In der vorliegenden Studie wurden bisher die weiteren Schicksale der Patienten nicht mit einbezogen. Allerdings wäre dies im Hinblick auf die Untersuchung der Expression von CEACAM1 und Galectin-3 ein interessanter Aspekt.

Anhand der Lokalisationsstudien mittels KLSM und Co-IP Analysen konnte eine Interaktion von Galectin-3 mit CEACAM1 während der Tumorgenese beobachtet werden (Abb. 4.14). Kolokalisationen wurden hauptsächlich im Übergangsgewebe, in Zellen, die sich zu Tumorzellen entwickeln, identifiziert (Abb. 4.14 B, C). Aber auch vereinzelt im Tumorgewebe ist eine Kolokalisation sichtbar. Die Expression von CEACAM1 beschränkt sich im normalen Gewebe auf den apikalen Zellpol von Epithelzellen des proximalen Tubulus (Abb. 4.14 B). Dies bestätigt die Beobachtungen von Prall und Kammerer (Kammerer *et al.*, 2004; Prall *et al.*, 1996). In RC-124 und RCC-FG1 Zellen konnten ebenfalls Kolokalisationen von CEACAM1 mit Galectin-3 in vesikulären Strukturen dargestellt werden (Abb. 4.14 A). Allerdings muss hier wieder die nicht vorhandene Polarität beider Zelllinien berücksichtigt werden. Eine Interaktion beider Proteine konnte letztendlich durch Co-IP Studien mit dem Zellkulturmodell und anhand von Gewebelysaten verifiziert werden (Abb. 4.14 D). Bisher ist eine Interaktion von CEACAM1 mit Galectin-3 aus humanen neutrophilen Granulozyten bekannt (Feuk-Lagerstedt *et al.*, 1999). Eine Interaktion zwischen beiden Proteinen ist aufgrund der zahlreichen Glykosylierungen von CEACAM1 und der hohen Bindungsaffinität von Galectin-3 zu diesen Zuckerverbindungen möglich (Hammarstrom, 1999). Zudem ist die apikale Sortierung dieses Proteins in MDCK-Zellen abhängig von Galectin-3 (Delacour *et al.*, 2006; Delacour *et al.*, 2007; Delacour *et al.*, 2008). Da diese Untersuchungen nur an fünf (KLSM) und drei (Co-IP) Patienten durchgeführt

wurde, müssten diese durch weitere Experimente unterstützt werden. Zudem wäre es interessant die Patientenparameter zu berücksichtigen. Die Frage, wie die Interaktion von Galectin-3 mit CEACAM1 die Tumorentstehung beeinflusst oder ob es wieder eine Folge daraus ist, bleibt noch offen.

5.1.7 Galectin-3 Bindungspartner in der Tumorentstehung

Mit Hilfe einer Galectin-3-Affinitätssäule und anschließender ESI-MS/MS Analyse konnten Bindungspartner von Galectin-3 in RC-124 und RCC-FG1 Zellen identifiziert werden (Abb. 4.15 und Tabelle 4.3). Die aufgeführten Proteine könnten bei der Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms eine entscheidende Rolle spielen. Weitere Untersuchungen zur Expression und Lokalisation sowie der Interaktion dieser Proteine mit Galectin-3 in Patientenproben könnte zu näheren Erkenntnissen der Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms führen.

Eine Interaktion von Galectin-3 mit β -Catenin konnte schon in Pankreaskrebs bestätigt werden (Kobayashi *et al.*, 2011). Dabei reguliert Galectin-3 die Phosphorylierung und den Abbau von β -Catenin durch Eingreifen in den Wnt-Signalweg. Dies fördert die Expression von Zellzyklus-regulierenden Proteinen wie Cyclin D und führt zur Unterstützung der Tumorprogression (Shimura *et al.*, 2005; Shimura *et al.*, 2004).

Die Interaktion von Galectin-3 mit Mucinen wurde bereits für MUC1 und MUC2 in diversen Enddarmkrebszelllinien (LS174T, HT29 und HT29-5F7) und der Brustkrebszelllinie HBL-100 beschrieben (Song *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010). Diese Interaktion unterstützt die Tumorzellaggregation und fördert die Metastasierung.

Eine Bindung von Galectin-3 an Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) wurde bereits in Mausenterozyten beschrieben (Delacour *et al.*, 2008). Hier spielt Galectin-3 eine essentielle Rolle bei der korrekten Sortierung der DPP IV zur apikalen Zellmembran. Somit wäre es auch interessant herauszufinden, wie die Sortierung dieses Proteins in Nierenzellen und Nierenzellkarzinomzellen funktioniert und ob es einen Einfluss auf die Tumorprogression haben könnte.

Zwei weitere interessante Bindungspartner sind das Galectin-3-Bindungsprotein (*Mac-2-binding protein* (MAC-2BP)) und der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF).

MAC-2BP besteht aus 90 kDa großen Untereinheiten und wird deshalb auch als 90K bezeichnet. Durch seine zahlreichen Glykosylierungen ist es ein potentieller Ligand für Galectin-3 und -1 (Koths *et al.*, 1993; Ullrich *et al.*, 1994). MAC-2BP wird in Epithelzellen vieler verschiedener Gewebe exprimiert und findet sich auch in Serum, Muttermilch und Urin (Iacobelli *et al.*, 1986; Koths *et al.*, 1993). Serum von Patienten mit unterschiedlichsten Krebsarten und Patienten mit HIV-Infektion zeigen einen erhöhten MAC-2BP-Gehalt im Serum (Natoli *et al.*, 1993; Ullrich *et al.*, 1994). Im Nierengewebe ist es schwach exprimiert und wird in Nierenzellkarzinomen hochreguliert (Becker *et al.*, 2008). Eine erhöhte Expression korreliert mit einer kürzeren Überlebensrate, dem Auftreten von Metastasen und einer verringerten Wirkung der Chemotherapie (Grassadonia *et al.*, 2004). Vermutlich trägt die Bindung von Galectin-3 an MAC-2BP entscheidend zur Metastasierung bei. Durch die Bindung kommt es zur Kreuzvernetzung von Tumorzellen. Dies sichert den Tumorzellen das Überleben im Blut und erleichtert die Bildung neuer Tumorkolonien (Inohara *et al.*, 1996). Die Interaktion von Galectin-3 und MAC-2BP könnte somit auch eine entscheidende Rolle bei der Progression und Metastasierung von klarzelligen Nierenzellkarzinomen spielen. Folglich wäre es interessant die Interaktion mittels ESI-MS/MS in Patientenproben nachzuweisen. Zur Unterstützung könnten noch immunhistochemische Untersuchungen erfolgen. Zusätzlich wären Untersuchungen zur Expression dieses Proteins in gesundem Nierengewebe und Tumorgewebe unter Berücksichtigung der Patientenparameter hilfreich.

MIF ist ein 12,5 kDa kleines Zytokin mit proinflammatorischen und anti-apoptotischen Eigenschaften. Neben seiner zentralen Rolle in immunologischen und inflammatorischen Antworten, stellt es eine essentielle Komponente in vielen Aspekten der Tumورprogression dar (Mitchell und Bucala, 2000). Eine Möglichkeit der Regulierung der MIF-Aktivität ist die Bindung zu anderen Proteinen. Beispielsweise im Urin von Patienten mit

Infektionen des Urogenitaltrakts konnte MIF im Komplex mit Uromodulin, Ceruloplasmin oder Albumin gefunden werden (Meyer-Siegler *et al.*, 2006). Somit könnte auch eine Interaktion mit Galectin-3 zur Aktivierung führen. Jung und Kollegen entdeckten eine physikalische Interaktion von MIF mit p53. Dabei hemmt MIF die p53-induzierte Apoptose und ist somit an der Tumorrogression beteiligt (Jung *et al.*, 2008). In Enddarmkrebs konnte bereits eine Korrelation der Expression von MIF und Galectin-3 gezeigt werden. Beide Proteinlevel sind im Tumorgewebe erhöht im Vergleich zum gesunden Gewebe (Legendre *et al.*, 2003).

5.2 Endozytose und Recycling von Galectin-3 an der apikalen Membran von Epithelzellen

Die Funktion von Galectin-3 als apikaler Sortierrezeptor für *raft unabhängige* Proteine ist weitreichend bekannt (Delacour *et al.*, 2006; Delacour *et al.*, 2009). Dieser apikale Sortierprozess beruht auf der Fähigkeit des Lectins mit seinen Liganden hochmolekulare Komplexe zu bilden (Delacour *et al.*, 2007). Hat Galectin-3 den Extrazellulärraum erreicht, kann es dort mit ECM-Proteinen interagieren oder erneut in die Zelle aufgenommen werden. Unmittelbar nach der Aufnahme befindet sich Galectin-3 in Rab11 positiven endosomalen Kompartimenten (Schneider *et al.*, 2010). In diesem Teil der Arbeit sollten die folgenden Hypothesen näher beleuchtet werden: Wird endozytiertes Galectin-3 erneut zur apikalen Membran transportiert und findet ein Kreislauf der Aufnahme und Abgabe des Lectins statt? Was ist der Mechanismus, den Galectin-3 für die Endozytose anwendet?

5.2.1 Apikales Recycling von Galectin-3

Bei der Untersuchung des möglichen Recyclings von Galectin-3 stellte sich heraus, dass in MDCK-Zellen exogen zugegebenes Galectin-3 nach der Endozytose erneut an die apikale Zellmembran transportiert und dort sekretiert

wird (Abb. 4.16). Sowohl die Fluoreszenzintensitätsmessungen als auch die Western-Blots zeigen, dass die Menge an rekombinantem Galectin-3 im Zellüberstand schon 30 min nach Start der Sekretion erheblich ansteigt (Abb. 4.16 A, B). Dagegen sinkt der Anteil im Zelllysat (Abb. 4.16 B, C). Die Menge an endogenen Galectin-3 im Zellüberstand steigt ebenfalls (Abb. 4.16 B), was sich dadurch erklären lässt, dass alles an der Oberfläche befindliche Galectin-3 vor Sekretionsstart entfernt wurde. Der intrazelluläre Anteil von endogenem Galectin-3 bleibt aufgrund der fortdauernden Proteinsynthese gleich. Der intrazelluläre Anteil des rekombinanten Lectins sinkt, da nur eine bestimmte Menge Galectin-3 auf die Zellen gegeben wurde und dieser Anteil jetzt in einer Art Kreislauf die Zelle kurz durchläuft. Alternativ ist auch ein Abbau eines Teils des rekombinanten Proteins in Lysosomen möglich. Die Hypothese des Recyclings von Galectin-3 konnte mit diesem Versuch bestätigt werden. Ein ähnliches Recyclingverhalten in MDCK-Zellen ist bereits für Galectin-9 bekannt (Mishra *et al.*, 2010). Und in Endothelzellen konnte bereits ein Transport von extern aufgenommenem Galectin-3 zur apikalen Membran beobachtet werden (Gao *et al.*, 2012). Ob Galectin-3 nach erfolgter Sekretion nochmals in die Zelle aufgenommen wird und der Zyklus sich erneut wiederholt, könnte in einem weiteren Experiment mit einem längeren Zeitverlauf untersucht werden.

5.2.2 Endozytose von Galectin-3

Die Aufnahme von Galectin-3 in die Zelle kann auf unterschiedlichem Weg erfolgen. Neben der Clathrin-abhängigen Endozytose existieren noch die Caveolin- bzw. Flotillin- abhängige Endozytose. Letztere sind mit *lipid rafts* assoziiert. Erste Ergebnisse lieferten Hinweise auf einen *lipid raft*-abhängigen Internalisierungsmechanismus von Galectin-3 in MDCK-Zellen. TIRFM-Analysen konnten eine Kolo-kalisation von Galectin-3 mit Caveolin-1 und Flotillin-1 zeigen (Greb, 2011; Straube *et al.*, 2013). Zusätzlich führte die Verwendung des *lipid raft* Inhibitors Filipin zu einer verringerten Aufnahme von Galectin-3 in MDCK-Zellen. Die Assoziation von Galectin-3 mit Flotillin-1 positiven Strukturen konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der GSD-

Mikroskopie verifiziert werden (Abb. 4.17 A). Etwa 10 min nach Start der Internalisierung konnte das Lectin in Flotillin-1 positiven Vesikeln detektiert werden. Derzeit werden zusätzlich 3D-GSDIM Aufnahmen von dieser Flotillin-abhängigen Endozytose von Galectin-3 angefertigt. Diese ermöglichen eine noch genauere Darstellung des Internalisierungsprozesses und können weiteren Aufschluss über die exakte Lokalisation beider Proteine geben. Durch die Verwendung eines weiteren *lipid raft* Inhibitors, Methyl- β -cyclodextrin, konnte eine signifikante Abnahme der Galectin-3-Aufnahme beobachtet werden (Abb. 4.17 B). Dies bestätigt ebenso den *lipid raft* abhängigen Endozytoseweg des Lectins.

Interessanterweise scheint Galectin-3 beim apikalen Proteintransport nicht mit *lipid rafts* assoziiert zu sein, während es bei der Endozytose den *lipid raft* abhängigen Weg bevorzugt. Die in dieser Arbeit vorliegenden DRM-Floating-Analysen offenbaren eine Assoziation von Galectin-3 mit *lipid rafts* während der Endozytose (Abb. 4.18) und zeigen einen Wechsel von Galectin-3 zwischen einem *raft* assoziierten und einem nicht *raft* assoziierten Zustand (Abb. 4.18 A, B). Dieser Wechsel ist zudem abhängig von den Zuckerbindungseigenschaften des Lectins, denn die Gal-3-Mutante R186S zeigte keine DRM-Assoziation in den gleichen Untersuchungen (Abb. 4.18 A, B). Bereits in vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zuckerbindung der Galectine für deren Internalisierung von essentieller Bedeutung ist. So zeigten Untersuchungen in MDCK-Zellen, dass die Endozytose von Galectin-3 durch Lactose inhibiert werden kann (Schneider *et al.*, 2010). Ebenso verursacht der Glykosylierungsinhibitor GalNac α -O-bn eine verminderte Aufnahme von Galectin-4 (Stechly *et al.*, 2009). In Makrophagen und Endothelzellen kann sich die Endozytose von Galectin-3 allerdings in einem zuckerabhängigen und -unabhängigen Weg vollziehen (Gao *et al.*, 2012; Lepur *et al.*, 2012a). Eine Bindung von Galectin-3 an Glykoproteine führt im sekretorischen Weg zu einer Komplexbildung, die essentiell ist für die Einsortierung apikaler Proteine in den korrekten Transportweg (Delacour *et al.*, 2007). Diese Kreuzvernetzungen könnten somit auch eine essentielle Rolle bei der Caveolin-abhängigen Endozytose spielen. Beispielsweise wird durch die Kreuzvernetzung der GPI

verankerten Plazenta-Alkalischen-Phosphatase (PLAP), dem Influenza Hämagglutinin und gp114 auf der apikalen Oberfläche von MDCK-Zellen die Ausbildung von Caveolae induziert (Verkade *et al.*, 2000).

Die Assoziation von Galectin-3 mit *lipid rafts* an der Zellmembran konnte bereits in einigen Zellen beobachtet werden. Beispielsweise wird in Brustkarzinomzellen die Stabilisation der Adhäsionsplaques durch Galectin-3 und Caveolin-1 reguliert (Goetz *et al.*, 2008). Weitere Untersuchungen in Brustkrebszellen zeigen eine Interaktion von Galectin-3 mit N-Cadherin und dem *lipid raft* Marker GM1 in Zell-Zell Verbindungen (Boscher *et al.*, 2012). Galectin-3 ist auch in Membranmikrodomänen in Lamellopodien von aktiven dendritischen Zellen lokalisiert und reguliert deren Migration (Hsu *et al.*, 2009). Zudem findet sich Caveolin-1 in Rab11 positiven Recycling-Endosomen in denen auch Galectin-3 nach der Endozytose anzutreffen ist (Lapierre *et al.*, 2012).

Die alternierende Assoziation von Galectin-3 mit *lipid rafts* könnte auch anhand von wechselnden Interaktionen mit Glykoproteinen erklärt werden. Diese Interaktionen lassen sich möglicherweise durch die unterschiedlichen pH-Werte in den endosomalen Kompartimenten und der Zellmembran erklären. Eine Neutralisation der Endosomen durch Chloroquin (Abb. 4.19) zeigte einen Einfluss auf die Assoziation von Galectin-3 mit *lipid rafts* (Abb. 4.20). Wechselt wie in den Kontrollzellen hingegen der pH von neutral zu leicht sauer, findet auch ein Wechsel zwischen DRM-assoziierten und DRM-unabhängigen Status statt (Abb. 4.20). Sobald die Endosomen neutralisiert sind, erfolgt eine permanente Assoziation von Galectin-3 mit *lipid rafts*. Der pH- Wert wirkt demnach am Wechsel zwischen *raft*-Assoziation und nicht *raft*-Assoziation von Galectin-3 in der Endozytose entscheidend mit.

Weitere Experimente konnten zeigen, dass eine Veränderung des extrazellulären pH einen Einfluss auf die Endozytoseeffizienz von rekombinantem Galectin-3 hat (Abb. 4.21). Bei einem extrazellulären pH von 7,4 ist die Endozytose am effizientesten. Sobald der pH sinkt, erfolgt eine verminderte Aufnahme von Galectin-3 in die Zelle (Abb. 4.21 A, B). Die gleichbleibende Menge an endogenem Galectin-3 ist aufgrund des *steady state*

Zustandes zu erklären. Gleichzeitige Experimente über die Bindungseffizienz von Galectin-3 an die Zelloberfläche von MDCK-Zellen bei neutralem und leicht saurem pH, konnten eine reduzierte Bindung bei saurem pH bestätigen (Straube *et al.*, 2013). Eine Ansäuerung des extrazellulären Milieus, wie es z.B. in der Niere der Fall ist, zeigte bereits eine verminderte Bindung und Aufnahme des Lectins in Epithelzellen von Nierentubuli (Kovacikova *et al.*, 2006). Die *lipid raft* abhängige Endozytose ist allerdings nicht *per se* vom extrazellulären pH Wert beeinflussbar. Für diesen Test wurde die Choleratoxin Untereinheit B ausgewählt, da dieses Protein in einem *lipid raft* abhängigen Mechanismus endozytiert wird (Fujinaga *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 1998). FACS Daten zeigen, dass die Aufnahme von Choleratoxin Untereinheit B vom sauren pH unbeeinflusst bleibt, während der Einfluss des pH auf die Endozytose von Galectin-3 nochmals bestätigt wird (Abb. 4.22 B). Aufgrund dieser Daten lässt sich sagen, dass die apikale Aufnahme von Galectin-3 in polare Epithelzellen pH abhängig ist. Die Aufnahme erfolgt vermutlich durch eine zuckerabhängige Assoziation von Galectin-3 mit DRMs über eine *lipid raft* abhängige Endozytose.

Allerdings wirft die Komplexbildung von Galectin-3 bei der Endozytose noch weitere Fragen auf. Die Endozytose der Gal-3-ΔN-Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp von Galectin-3 ebenfalls eine verminderte Aufnahme in die Zelle (Abb. 4.22 B). Aufgrund der fehlenden Fähigkeit zur Komplexbildung kommt es vermutlich bei einer Bindung von Gal-3-ΔN an Glykoproteine an der Zelloberfläche zu keiner Kreuzvernetzung und eine Bildung von *lipid raft clustern* bleibt aus. Andererseits ist eine Multimerisierung über die C-terminale Domäne möglich und die Kreuzvernetzung könnte stattfinden. Eine Assoziation dieser Mutante mit *lipid rafts* müsste somit noch geklärt werden sowie die Frage nach alternativen Endozytosewegen und deren pH-Abhängigkeit. Weiterhin stellt sich auch die Frage, ob denn alle Galectine an der Komplexbildung beteiligt sein müssen, wenn sie endozytiert werden. Interessant wäre auch die Identifikation der Bindungspartner auf der Zelloberfläche. Diese Fragen müssten in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden, um den genauen Mechanismus der Endozytose von Galectin-3 zu verstehen.

5.2.3 Abhängigkeit der p75^{NTR} Sortierung von Galectin-3

Galectin-3 fungiert in MDCK-Zellen als apikaler Sortierrezeptor für p75^{NTR}. Eine Deletion des Lectins führt zur Fehlsortierung des Neurotrophinrezeptors (Delacour *et al.*, 2006). Eine externe Zugabe von rekombinantem Galectin-3 stellt die vermehrte Sortierung von p75^{NTR} zur apikalen Zellmembran wieder her (Abb. 4. 23). Ein *knock down* von endogenem Galectin-3 konnte mit zwei spezifischen siRNAs gegen das Lectin erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 4.23 C). Unter diesen Umständen konnte eine eindeutige Fehlsortierung von p75^{NTR} zur basolateralen Membran durch KLSM und Oberflächenbiotinylierung beobachtet werden (Abb. 4.23 A, B, D). Die Zugabe von rekombinantem Galectin-3 führte zur Wiederherstellung der ursprünglichen Transport-Polarität von p75^{NTR} bzw. es konnte sogar eine leicht verstärkte apikale Sortierung im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 4.23 A, B, D). Die Vermutung, dass Galectin-3 die p75-Sortierung in unbehandelten MDCK-Zellen *per se* steigern kann, konnte nicht bewiesen werden (Abb. 4.23 E). Diese Beobachtungen zeigen eine bereits existierende optimale Sortierung von p75^{NTR}. Ähnliche Sortiereffekte wurden bei Hämagglutinin (HA) in Galectin-9-defizienten MDCK-Zellen beobachtet. Durch Zugabe von rekombinantem Galectin-9 konnte auch hier die Sortierung wieder hergestellt werden (Mishra *et al.*, 2010). Ein *knock down* von Galectin-4 in Enterozyten führte zu einer Verzögerung des Transportes von DPPIV und konnte ebenfalls durch Zugabe rekombinanten Lectins rückgängig gemacht werden (Stechly *et al.*, 2009).

Diese Versuche und das Ergebnis der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass Galectine für den apikalen Transport bestimmter Cargoproteine eine essentielle Rolle spielen. In HAT-29 Zellen interagiert Galectin-4 mit Sulfatiden und induziert die Bildung von *lipid raft* Transportplattformen zur apikalen Membran (Delacour *et al.*, 2005). Weiterhin zeigte sich, dass die Assoziation von Galectin-9 mit dem Forssman Glykosphingolipid den erfolgreichen Transport von Cargoproteinen zur apikalen Membran bewirkt (Mishra *et al.*, 2010). Diese Galectin-9 Sortierplattformen sind ebenfalls entscheidend am Transport des raft unabhängigen Sialomucins Endolyn in renalen Epithelzellen beteiligt (Mo *et al.*, 2012). Galectin-3 konnte bereits als apikaler Sortierrezeptor für p75^{NTR}

identifiziert werden (Delacour *et al.*, 2007). Dabei kommt es zur Komplexbildung mit dem Neurotrophinrezeptor in einem post-Golgi Kompartiment. In diesem Zusammenhang konnte durch weitere Analysen in unserem Labor festgestellt werden, dass extern aufgenommenes rekombinantes Galectin-3 mit neusynthetisierten Cargoproteinen in einem vermutlich endosomalen Kompartiment zusammentreffen (Straube *et al.*, 2013). Eine Interaktion von aufgenommenem rekombinanten Galectin-3 und p75^{NTR} konnte mittels Co-IP Studien dargestellt werden. Zusätzlich wurde mit Hilfe der SNAP-Tag Methode und anschließender KLSM die Assoziation von neu synthetisiertem p75^{NTR} mit Galectin-3 in intrazellulären Kompartimenten von MDCK-Zellen beobachtet (Straube *et al.*, 2013). Die genaue Identität der endosomalen Kompartimente wird zurzeit in unserem Labor verifiziert. Galectin-3, -4 und -9 sind bereits auf dem Weg zur apikalen Membran in Rab11 positiven endosomalen Kompartimenten detektiert worden (Cramm-Behrens *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2010; Simons und Wandering-Ness, 1990). Somit stellen sie auch für diese Frage mögliche Kandidaten dar.

5.2.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Sortierung von p75^{NTR} und die Sekretion von gp80

Auf dem Weg zur apikalen Zellmembran passieren Galectin-3 und seine Glykoliganden endosomale Kompartimente, die sich in ihrem pH voneinander und von dem neutralen pH des Extrazellulärtraumes unterscheiden. Der mögliche Einfluss des endosomalen pH-Wertes auf die Sortierung von Cargoproteinen wurde bereits einige Male adressiert (Henkel *et al.*, 2000; Matlin, 1986; Pilarsky und Koch-Brandt, 1992) und in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf p75^{NTR} und gp80 untersucht. Durch Verwendung von NH₄Cl wird der pH in endosomalen Kompartimenten von MDCK Zellen in den basischen Bereich verschoben (Maxfield, 1982). Dies konnte durch die Verwendung des pH-sensitiven Farbstoffes pHrodo kontrolliert werden (Abb. 4.24). Die Zugabe von Lactose dient der Inhibition der Zuckerbindung des Sortierrezeptors Galectin-3. Die alleinige Anwesenheit von NH₄Cl zeigte keinen signifikanten Unterschied in der apikalen/basolateralen Verteilung von p75^{NTR} (Abb. 4.27 A,

C). Erst durch zusätzliche Anwesenheit von Lactose verschiebt sich die Polarität, der Neurotrophinrezeptors ist nun stärker an der basolateralen Zellmembran lokalisiert (Abb. 4.27 B, C). Die membranständige Menge des basolateralen Markerproteins CD29 wird durch Zugabe von NH_4Cl und/oder Lactose nicht merklich beeinflusst (Abb. 4.27 A, B, D).

Veränderungen des endosomalen pH können dazu führen, dass Cargoproteinen in einen alternativen Transportweg sortiert werden. Dabei bleibt die Bindung der Liganden an z.B. Sortierrezeptoren nicht unbeeinflusst. Beispielsweise wird die endosomale Sortierung vom Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6P) durch die endosomale Neutralisation beeinflusst (Waguri *et al.*, 2006). Dies ist auf ein gestörtes Bindungs- und Dissoziationsverhalten der M6P-Liganden in den Endosomen zurückzuführen. In verschiedenen Krebszelllinien wie MCF-7 und Caco herrscht eine gestörte Ansäuerung der Endosomen, die zu einer anomalen Sortierung des M6P-Liganden Cathepsin-D führt (Kokkonen *et al.*, 2004). Im Hinblick auf die Galectin-3-abhängige Sortierung von p75^{NTR} , ist eine genaue Sortierung des Neurotrophinrezeptors vermutlich von verschiedenen Faktoren, wie dem endosomalen pH und der Ligandenbindung abhängig. Somit ist es wichtig alle Komponenten des Galectin-3-Glykoprotein Netzwerkes zu identifizieren und herauszufinden was für einen Einfluss der pH-Wechsel zwischen Plasmamembran und Endosomen darauf hat.

Bei der Sekretion von gp80 konnte wiederum ein Einfluss auf die Sekretion nach Behandlung mit NH_4Cl beobachtet werden (Abb. 4.25 A). Die apikale Sekretion dieses Glykoproteins wird durch 20 mM NH_4Cl gesteigert. Jedoch findet keine weitere Steigerung der apikalen Sekretion in Abhängigkeit von der NH_4Cl -Konzentration statt. Erst die Zugabe von Lactose führt zu einer weiteren Erhöhung der apikalen Sekretion (Abb. 4.25 B). Die basolaterale Menge an gp80 ist dagegen reduziert. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass der entsprechende Anteil von gp80 apikal sortiert wird oder es findet eine intrazelluläre Akkumulation statt. Anhand von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen könnte diese Frage geklärt werden. Die insgesamt von der Zelle sekretierte Menge an gp80 wird durch die Änderung des pH-Wertes nur

geringfügig beeinflusst (Abb. 4.26 A). Erst bei gleichzeitiger Anwesenheit von Lactose sinkt die Menge an sekretiertem gp80 (Abb. 4.26 B). Hier stellt sich wieder die Frage nach einer intrazellulären Akkumulation verursacht durch einen gestörten Transport. Durch Verschiebung des endosomalen pH in den basischen Bereich und Anwesenheit von Lactose reduziert sich die relative Menge an sekretiertem gp80. Gleichzeitig erfolgt neben dieser Reduktion eine Verschiebung des apikal sortierten Anteils von gp80. Die Sortierung von gp80 unterliegt vermutlich einem feinen Zusammenspiel von pH-Wert und Lactose bzw. Sortierrezeptoren, die durch Lactose beeinflussbar sind. Dies müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Untersuchungen von Parczyk und Kollegen konnten bereits zeigen, dass NH_4Cl einen Dosis-abhängigen Einfluss auf die Sortierung von gp80 in MDCK-Zellen hat (Parczyk und Kondor-Koch, 1989). Dabei steigt das Verhältnis von apikaler zu basolateraler Sekretion des Glykoproteins um das zweifache an. Zusätzlich konnten sie noch eine minimale Verzögerung beim Transport des Proteins zur Zellmembran beobachten. Dies könnte die Reduktion der relativen gp80-Menge in der vorliegenden Arbeit erklären. Ein zukünftiges Experiment bei dem sekretiertes gp80 über einen bestimmten Zeitraum gesammelt wird, könnte Aufschluss darüber geben.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der sich in Untersuchung der gp80-Sekretion gezeigt hat, ist der Effekt, der durch Lactose ausgelöst wurde. Der Einfluss von Lactose auf die Sortierung von p75^{NTR} ließe sich durch ein Lectin als Sortierrezeptor, wie z.B. Galectin-3 erklären. Bisher wurden zwei Rezeptoren mit der Sekretion von gp80 in Verbindung gebracht, das Membranprotein MAL und eine Überexpression des Lectins VIP36 (Hara-Kuge *et al.*, 2002; Martin-Belmonte *et al.*, 2001) führten zur Steigerung der gp80 Sekretion. Ob Galectin-3 im Fall von gp80 ebenfalls als Sortierrezeptor fungiert, bleibt noch zu klären. Eine Interaktion von Galectin-3 mit gp80 kann aufgrund der Glykosylierung möglich sein. Mit Hilfe von Co-IP Studien könnte diese Frage geklärt werden. Eine pH-abhängige Sortierung von gp80 lässt sich ebenso wie für p75^{NTR} bestätigen. Allerdings bleibt noch offen, was die pH-Änderung im Sortierprozess beider Proteine beeinflusst. Neben der Transportroute kann auch die

Vesikelformation oder die Fusion der Vesikel mit der Zielmembran beeinträchtigt sein (Connor *et al.*, 1984; White *et al.*, 1983). Diese Aspekte stellen ebenso interessante Fragestellungen für zukünftige Experimente auf.

5.3 Einfluss des pH Wertes auf die Galectin-3 Ligandenbindung und Komplexbildung

Galectin-3 ist in der Lage über seine CRD Glykoproteine zu binden und diese anschließend durch seine N-Terminale Domäne zu hochmolekularen *clustern* zu verbinden. Diese Kreuzvernetzung nimmt z.B. Einfluss auf die intrazelluläre Signalweitergabe durch Bindung an das Extrazellulärprotein Hensin (Hikita *et al.*, 2000) oder in der Stabilisation von fokalen Adhäsionsplaques durch Rekrutierung von Glykoproteinen (Goetz *et al.*, 2008). Aber auch intrazellulär spielt die Bindung und Kreuzvernetzung der Liganden eine essentielle Rolle im apikalen Proteintransport (Delacour *et al.*, 2007). Die verschiedenen Orte, an denen Ligandenbindung und -kreuzvernetzung stattfinden können, zeichnen sich durch unterschiedlichen pH-Werte aus. Dieser Abschnitt sollte erste Aufschlüsse über den Einfluss des pH auf die Bindung und Komplexbildung von Galectin-3 mit seinen Glykoliganden geben.

5.3.1 Einfluss des pH-Wert auf die Ligandenbindung

Zur Untersuchung der Bindungsaffinität wurden verschiedene Liganden ausgewählt, Lactosylsepharose-Beads, die auch bei der Produktion von rekombinantem Galectin-3 verwendet werden und zwei weitere Liganden, 2`Fucosyllactose (FucLac) und das Blutgruppenglykan A-Tetra (A-Tetra). Da es sich bei der Untersuchung mit Lactose um erste Versuche zur Bindung von Galectin-3 an seine Liganden handelte, wurden diese mittels einer Lactosylsepharosebeads-Säule mit anschließendem Western-Blot oder Proteinkonzentrationsmessung bei 280 nm durchgeführt. Die Daten zur Bindung an FucLac und A-Tetra wurden erst später mittels Fluoreszenzpolarisation ermittelt. Die Bindung von rekombinantem Galectin-3

und einer Galectin-3 Mutante (TrxGal-3C), die ihre Eigenschaft zur Komplexbildung verloren hat, zeigte bei einem pH von 7,4; 6,5 und 5,9 sowohl im Western-Blot als auch bei der Proteinkonzentrationsbestimmung bei 280nm keine Veränderung (Abb. 4.28). Die Bindung an Lactose ist somit nicht vom pH-Wert beeinflussbar, was auch vorherige Studien bereits zeigen konnten (Salomonsson *et al.*, 2010; Sparrow *et al.*, 1987). Zusätzliche Fluoreszenzpolarisationsstudien von Galectin-3 mit A-Tetra und Lactose zeigen, dass Lactose auch bei pH 5 noch in der Lage ist die Bindung von A-Tetra an Galectin-3 zu blockieren (von Mach, unveröffentlichte Daten). Demgegenüber zeigen die Fluoreszenzpolarisationsstudien mit FucLac und A-Tetra, dass die Bindung von Galectin-3 pH-abhängig verläuft (Abb. 4.29). Mit zunehmender Galectin-3-Konzentration steigt die Anisotropie, was die vermehrte Bildung von Protein-Protein-Interaktionen anzeigt. Die Bindungskurven verschieben sich auf der x-Achse ab einem pH < 6 nach rechts und die Dissoziationskonstante (K_d) erhöht sich, was eine verminderte Bindungsaffinität bedeutet.

Die Bindung zu einem Liganden kann durch eine pH-vermittelte Veränderung der Aminosäuren in der Galectin-3-Bindungstasche erfolgen. Da Histidine sehr pH-sensitiv sind und bisherige Studien einen Einfluss auf die Ligandenbindung feststellen konnten (Doster *et al.*, 1982; Wendland *et al.*, 1991), könnte His-158 in der Bindungstasche von Galectin-3 dafür verantwortlich sein.

Je nach Ligand ist die Abhängigkeit der Bindungsaffinität vom pH-Wert unterschiedlich. Sie spielt anscheinend eine große Rolle bei der Regulation des Proteintransports. Der wechselnde pH während des Transports ist z.B. für die Konformationsänderung zahlreicher Rezeptoren zuständig, was zur Freilassung ihrer Liganden führt (Huotari und Helenius, 2011). Ein ähnliches Phänomen des pH-abhängigen Proteintransports von Glykoproteinen wurde auch für Galectin-1- beschrieben (Carlsson *et al.*, 2011).

5.3.2 Einfluss des pH-Wert auf die Komplexbildung

ASF ist ein multivalentes Glykoprotein mit neun Bindungsstellen für Galectin-3 (Gupta und Brewer, 1994). Galectin-3 hat eine hohe Affinität zu multivalenten Glykoproteinen (Dam *et al.*, 2005) und induziert bei dessen Bindung eine Kreuzvernetzung (Ahmad *et al.*, 2004). Diese Funktion der Komplexbildung ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt wie z.B. Beteiligung an der Signaltransduktion durch Kreuzvernetzung von Oberflächenrezeptoren auf der Zelle sowie an Proteintransport, Apoptose und Zellwachstum (Lau *et al.*, 2007; Pace *et al.*, 1999). Eine Komplexbildung von ASF mit Galectinen induziert auch die Aggregation von Tumorzellen (Inohara und Raz, 1995). In Anwesenheit von ASF kommt es innerhalb von Sekunden zur Komplexbildung mit Galectin-3, was in einer Trübung der Lösung zu erkennen ist (Abb. 4.30 A). Diese Trübung wurde in Abhängigkeit vom pH mittels einer Absorptionsmessung bei 475 nm gemessen, um Aufschluss über die Komplexbildung zu erhalten. 475 nm ergaben sich durch die Messung eines Absorptionsspektrums von Galectin-3 gegen den reinen verwendeten Puffer. Die relative Turbidität bei 475 nm von Galectin-3 mit ASF zeigte bei einem pH von 6,5 ihr Maximum (Abb. 4.30 A). ASF und Galectin-3 alleine ergaben sehr geringe Messwerte, was eine Induktion der Komplexbildung durch ein Protein alleine ausschließt. Die Durchführung des gleichen Experimentes mit der Galectin-3-Mutante Trx-Gal-3-ΔN zeigt, dass bei einem Verlust der N-Terminalen Domäne, die für die Komplexbildung verantwortlich ist, keine Kreuzvernetzung mit ASF stattfinden kann (Abb. 4.30). Die bei pH 5 gemessene Erhöhung der Turbidität könnte durch mögliche Proteindegradation verursacht worden sein. Das Maximum der Komplexbildung bei pH 6,5 lässt auf das Recycling Endosom als möglichen Ort der Komplexbildung schließen. Die weiteren Fluoreszenzpolarisationsstudien sollten weiteren Aufschluss über die Komplexbildung mit ASF geben. Bei diesem kompetitiven Versuchsansatz blockiert ASF als Inhibitor die Bindung von FucLac an Galectin-3 und die multivalente Kurve (Quadrate) verschiebt sich bei pH 7,5 nach rechts (Abb. 4.30 B). Auffällig ist, dass die Steigung der gemessenen Kurve (Quadrate) flacher ist, als die der theoretischen Kurve (gepunktete Linie). Dies deutet darauf hin,

dass trotz steigender Galectin-3-Konzentration die Menge an Galectin-3 zur Ligandenbindung geringer ist als erwartet. Vermutlich ist die Selbstassoziation des Lectins über seine C-terminale Domäne dafür verantwortlich (Lepur *et al.*, 2012b). Mit zunehmend saurem pH gleichen sich die gemessenen Kurven mehr an die theoretischen Kurven an, was wiederum einen Rückgang der C-Typ-vermittelten Selbstassoziation bedeutet. Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Komplexbildung von Galectin-3 mit ASF und die C-Typ-vermittelte Selbstassoziation des Lectins pH-abhängig sind. Diese Ergebnisse geben noch keine Erkenntnisse über den genauen Vorgang der Komplexbildung. Da die Ligandenbindung und Komplexbildung für zahlreiche Prozesse von Galectin-3, wie der Endozytose und dem Proteintransport essentiell sind, werden derzeit weitere Untersuchungen dazu durchgeführt (von Mach, unveröffentlicht).

5.4 Modell zur Endozytose und Rezyklierung von Gal-3

Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten lässt sich ein Modell zur Endozytose und dem Rezyklierungsprozess von Galectin-3 in polaren Epithelzellen erstellen (Abb. 5.1). Im Extrazellularraum befindliches Galectin-3 bindet abhängig vom pH-Wert an glykosylierte Liganden in *lipid raft* angereicherten Membrandomänen auf der apikalen Zelloberfläche. Um welche Liganden es sich dabei genau handelt und in wie weit die Komplexbildung dabei eine Rolle spielt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Galectin-3 gelangt mit seinem Liganden in einem *lipid raft* abhängigen Endozytoseweg in das frühe Endosom. Hier kommt es vermutlich aufgrund des sauren pH von ~ 6,3 zur Trennung von Galectin-3 und seinen Glykoliganden. Anschließend gelangt Galectin-3 in das Recycling Endosom, wo es mit neu synthetisierten Cargoproteinen wie z.B. p75^{NTR} zusammentrifft. In diesem post-Golgi Kompartiment erfolgt nun die Trennung in einen *lipid raft* abhängigen und einen *lipid raft* unabhängigen Transportweg zu apikalen Zellmembran. Dabei spielt die Kreuzvernetzung von Galectin-3 mit nicht *raft* assoziierten Cargoproteinen unter Einfluss des pH von ~6,5 eine entscheidende Rolle. Galectin-3 wird mit seinen

Liganden in einem *lipid raft* unabhängigen Transportprozess zur apikalen Membran transportiert und in den Extrazellulärraum entlassen. Von dort kann es erneut *lipid raft* abhängig in die Zelle aufgenommen werden und in einen neuen apikalen Sortierprozess einsteigen.

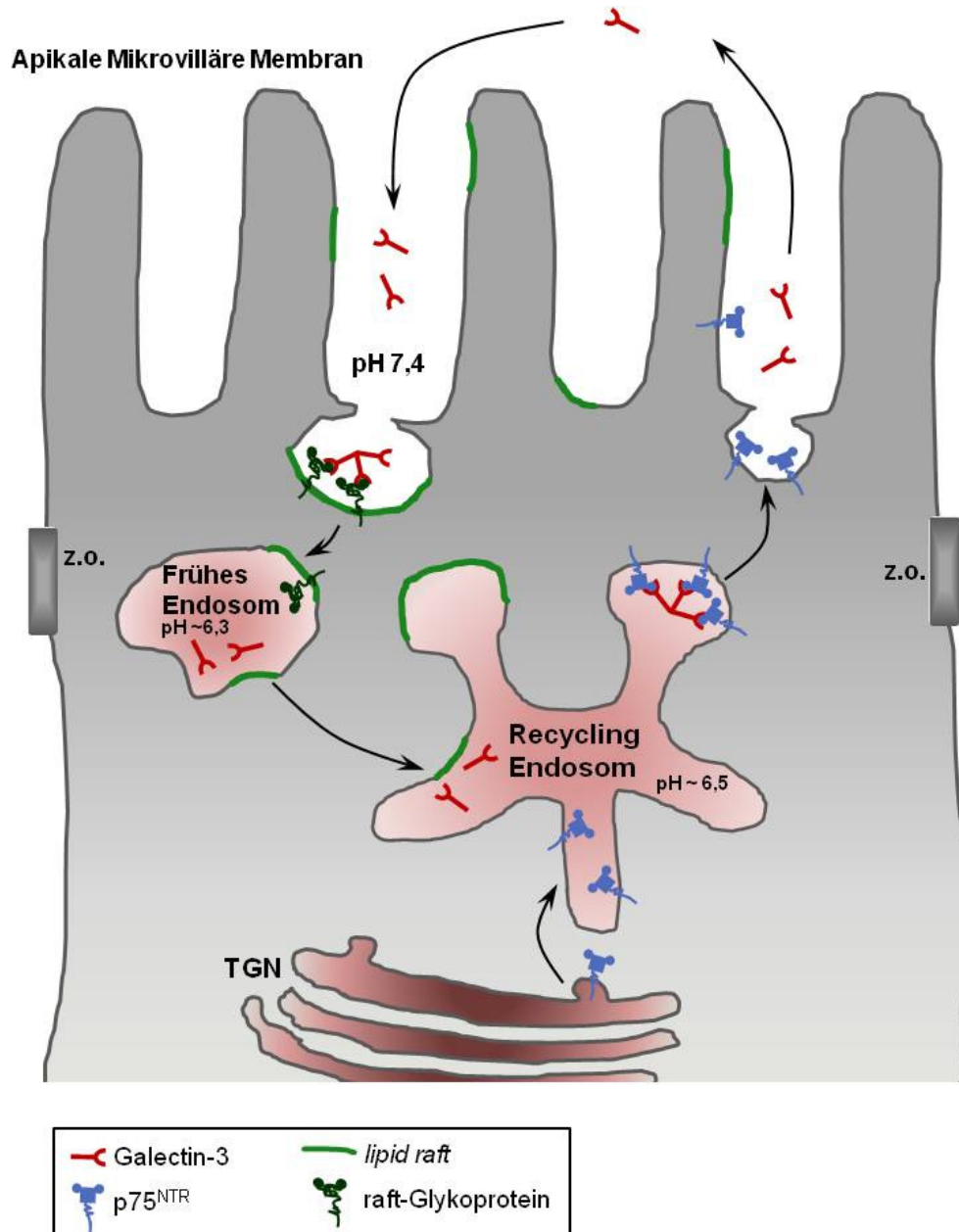


Abb. 5.1 Modell der Endozytose und der Rezyklierung von Galectin-3

TGN, Trans-Golgi-Netzwerk; z.o., zonula occludens

6 Literaturverzeichnis

- Ahmad, N., Gabius, H.J., Andre, S., Kaltner, H., Sabesan, S., Roy, R., Liu, B., Macaluso, F., Brewer, C.F., **2004**, Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem* 279, 10841-10847.
- Alfalah, M., Jacob, R., Preuss, U., Zimmer, K.P., Naim, H., Naim, H.Y., **1999**, O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr Biol* 9, 593-596.
- Andre, S., Kojima, S., Yamazaki, N., Fink, C., Kaltner, H., Kayser, K., Gabius, H.J., **1999**, Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in biodistribution of free and liposome-bound galectins and in their expression by breast and colorectal carcinomas with/without metastatic propensity. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 461-474.
- Ang, A.L., Taguchi, T., Francis, S., Folsch, H., Murrells, L.J., Pypaert, M., Warren, G., Mellman, I., **2004**, Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol* 167, 531-543.
- Azimzadeh, J., Bornens, M., **2007**, Structure and duplication of the centrosome. *J Cell Sci* 120, 2139-2142.
- Bacallao, R., Antony, C., Dotti, C., Karsenti, E., Stelzer, E.H., Simons, K., **1989**, The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol* 109, 2817-2832.
- Bacchi, C.E., Gown, A.M., **1991**, Distribution and pattern of expression of villin, a gastrointestinal-associated cytoskeletal protein, in human carcinomas: a study employing paraffin-embedded tissue. *Lab Invest* 64, 418-424.
- Balasubramanian, K., Vasudevamurthy, R., Venkateshaiah, S.U., Thomas, A., Vishweshwara, A., Dharmesh, S.M., **2009**, Galectin-3 in urine of cancer patients: stage and tissue specificity. *J Cancer Res Clin Oncol* 135, 355-363.
- Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Leffler, H., **1994**, Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269, 20807-20810.

- Bastaki, M., Braiterman, L.T., Johns, D.C., Chen, Y.H., Hubbard, A.L., **2002**, Absence of direct delivery for single transmembrane apical proteins or their "Secretory" forms in polarized hepatic cells. *Mol Biol Cell* 13, 225-237.
- Becker, R., Lenter, M.C., Vollkommer, T., Boos, A.M., Pfaff, D., Augustin, H.G., Christian, S., **2008**, Tumor stroma marker endosialin (Tem1) is a binding partner of metastasis-related protein Mac-2 BP/90K. *FASEB J* 22, 3059-3067.
- Bedford, J.J., Leader, J.P., Walker, R.J., **2003**, Aquaporin expression in normal human kidney and in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 14, 2581-2587.
- Behrens, J., Birchmeier, W., Goodman, S.L., Imhof, B.A., **1985**, Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J Cell Biol* 101, 1307-1315.
- Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M.M., Birchmeier, W., **1993**, Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120, 757-766.
- Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., Stanners, C.P., **1989**, Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57, 327-334.
- Berka, U., Khan, A., Blaas, D., Fuchs, R., **2009**, Human rhinovirus type 2 uncoating at the plasma membrane is not affected by a pH gradient but is affected by the membrane potential. *J Virol* 83, 3778-3787.
- Bornens, M., **2008**, Organelle positioning and cell polarity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 874-886.
- Boscher, C., Zheng, Y.Z., Lakshminarayan, R., Johannes, L., Dennis, J.W., Foster, L.J., Nabi, I.R., **2012**, Galectin-3 protein regulates mobility of N-cadherin and GM1 ganglioside at cell-cell junctions of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 287, 32940-32952.
- Bresalier, R.S., Mazurek, N., Sternberg, L.R., Byrd, J.C., Yunker, C.K., Nangia-Makker, P., Raz, A., **1998**, Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the beta-galactoside-binding protein galectin 3. *Gastroenterology* 115, 287-296.

- Bretscher, A., Weber, K., **1980**, Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner. *Cell* 20, 839-847.
- Breuza, L., Garcia, M., Delgrossi, M.H., Le Bivic, A., **2002**, Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp Cell Res* 273, 178-186.
- Brown, D.A., London, E., **1998**, Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.
- Brown, D.A., Rose, J.K., **1992**, Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Burnette, W.N., **1981**, "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Califice, S., Castronovo, V., Bracke, M., van den Brule, F., **2004a**, Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene* 23, 7527-7536.
- Califice, S., Castronovo, V., Van Den Brule, F., **2004b**, Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol* 25, 983-992.
- Campbell, C.E., Kuriyan, N.P., Rackley, R.R., Caulfield, M.J., Tubbs, R., Finke, J., Williams, B.R., **1998**, Constitutive expression of the Wilms tumor suppressor gene (WT1) in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 78, 182-188.
- Carlsson, M.C., Cederfur, C., Schaar, V., Balog, C.I., Lepur, A., Touret, F., Salomonsson, E., Deelder, A.M., Ferno, M., Olsson, H., Wuhrer, M., Leffler, H., **2011**, Galectin-1-binding glycoforms of haptoglobin with altered intracellular trafficking, and increase in metastatic breast cancer patients. *PLoS One* 6, e26560.
- Casey, J.R., Grinstein, S., Orlowski, J., **2010**, Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 50-61.
- Castronovo, V., Van Den Brule, F.A., Jackers, P., Clausse, N., Liu, F.T., Gillet, C., Sobel, M.E., **1996**, Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol* 179, 43-48.

- Chen, T., Zimmermann, W., Parker, J., Chen, I., Maeda, A., Bolland, S., **2001**, Biliary glycoprotein (BGP α , CD66a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J Leukoc Biol* 70, 335-340.
- Cheville, J.C., Lohse, C.M., Zincke, H., Weaver, A.L., Blute, M.L., **2003**, Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 27, 612-624.
- Chiu, M.G., Johnson, T.M., Woolf, A.S., Dahm-Vicker, E.M., Long, D.A., Guay-Woodford, L., Hillman, K.A., Bawumia, S., Venner, K., Hughes, R.C., Poirier, F., Winyard, P.J., **2006**, Galectin-3 associates with the primary cilium and modulates cyst growth in congenital polycystic kidney disease. *Am J Pathol* 169, 1925-1938.
- Connor, J., Yatvin, M.B., Huang, L., **1984**, pH-sensitive liposomes: acid-induced liposome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1715-1718.
- Cramm-Behrens, C.I., Dienst, M., Jacob, R., **2008**, Apical cargo traverses endosomal compartments on the passage to the cell surface. *Traffic* 9, 2206-2220.
- Dam, T.K., Gabius, H.J., Andre, S., Kaltner, H., Lensch, M., Brewer, C.F., **2005**, Galectins bind to the multivalent glycoprotein asialofetuin with enhanced affinities and a gradient of decreasing binding constants. *Biochemistry* 44, 12564-12571.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., Helenius, A., **2005**, Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol* 168, 477-488.
- Dancer, J.Y., Truong, L.D., Zhai, Q., Shen, S.S., **2010**, Expression of Galectin-3 in renal neoplasms: a diagnostic, possible prognostic marker. *Arch Pathol Lab Med* 134, 90-94.
- Danguy, A., Camby, I., Kiss, R., **2002**, Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1572, 285-293.
- Davidson, P.J., Davis, M.J., Patterson, R.J., Ripoché, M.A., Poirier, F., Wang, J.L., **2002**, Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology* 12, 329-337.
- Davidson, P.J., Li, S.Y., Lohse, A.G., Vandergaast, R., Verde, E., Pearson, A., Patterson, R.J., Wang, J.L., Arnoys, E.J., **2006**, Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import. *Glycobiology* 16, 602-611.

- Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R., Rodriguez-Boulan, E., **2008**, Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* 452, 719-723.
- Decker, H.J., **1998**, Molekulargenetische Diagnostik und Histopathologie epithelialer Nierentumore. *Onkologie* 4, 214-220.
- Decker, H.J., **2002**, Nierenzellkarzinome. *Springer*.
- Deinhardt, K., Reversi, A., Berninghausen, O., Hopkins, C.R., Schiavo, G., **2007**, Neurotrophins Redirect p75NTR from a clathrin-independent to a clathrin-dependent endocytic pathway coupled to axonal transport. *Traffic* 8, 1736-1749.
- Delacour, D., Cramm-Behrens, C.I., Drobecq, H., Le Bivic, A., Naim, H.Y., Jacob, R., **2006**, Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol* 16, 408-414.
- Delacour, D., Gouyer, V., Zanetta, J.P., Drobecq, H., Leteurtre, E., Grard, G., Moreau-Hannedouche, O., Maes, E., Pons, A., Andre, S., Le Bivic, A., Gabius, H.J., Manninen, A., Simons, K., Huet, G., **2005**, Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol* 169, 491-501.
- Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le Bivic, A., Jacob, R., **2007**, Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic* 8, 379-388.
- Delacour, D., Jacob, R., **2006**, Apical protein transport. *Cell Mol Life Sci* 63, 2491-2505.
- Delacour, D., Koch, A., Ackermann, W., Eude-Le Parco, I., Elsasser, H.P., Poirier, F., Jacob, R., **2008**, Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes in vivo. *J Cell Sci* 121, 458-465.
- Delacour, D., Koch, A., Jacob, R., **2009**, The role of galectins in protein trafficking. *Traffic* 10, 1405-1413.
- Diehl, C., Genheden, S., Modig, K., Ryde, U., Akke, M., **2009**, Conformational entropy changes upon lactose binding to the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *J Biomol NMR* 45, 157-169.
- Doster, W., Beece, D., Bowne, S.F., Dilorio, E.E., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Reinisch, L., Shyamsunder, E., Winterhalter, K.H., Yue, K.T., **1982**, Control and pH dependence of ligand binding to heme proteins. *Biochemistry* 21, 4831-4839.

- Duffield, A., Caplan, M.J., Muth, T.R., **2008**, Protein trafficking in polarized cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 270, 145-179.
- Dumic, J., Dabelic, S., Fogel, M., **2006**, Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 1760, 616-635.
- Duran, J.M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W.F., Malhotra, V., **2010**, Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol* 188, 527-536.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., **2001**, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Ergun, S., Kilik, N., Ziegeler, G., Hansen, A., Nollau, P., Gotze, J., Wurmbach, J.H., Horst, A., Weil, J., Fernando, M., Wagener, C., **2000**, CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell* 5, 311-320.
- Erlandson, R.A., Shek, T.W., Reuter, V.E., **1997**, Diagnostic significance of mitochondria in four types of renal epithelial neoplasms: an ultrastructural study of 60 tumors. *Ultrastruct Pathol* 21, 409-417.
- Esteban, M.A., Harten, S.K., Tran, M.G., Maxwell, P.H., **2006**, Formation of primary cilia in the renal epithelium is regulated by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Am Soc Nephrol* 17, 1801-1806.
- Fajka-Boja, R., Blasko, A., Kovacs-Solyom, F., Szebeni, G.J., Toth, G.K., Monostori, E., **2008**, Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 65, 2586-2593.
- Feuk-Lagerstedt, E., Jordan, E.T., Leffler, H., Dahlgren, C., Karlsson, A., **1999**, Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J Immunol* 163, 5592-5598.
- Fiedler, K., Kobayashi, T., Kurzchalia, T.V., Simons, K., **1993**, Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 32, 6365-6373.
- Fischer, C.G., **1999**, [Etiology, pathogenesis and therapy of renal cell carcinoma]. *Radiologe* 39, 343-349.
- Fliegauf, M., Benzing, T., Omran, H., **2007**, When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 880-893.

- Folling, J., Bossi, M., Bock, H., Medda, R., Wurm, C.A., Hein, B., Jakobs, S., Eggeling, C., Hell, S.W., **2008**, Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat Methods* 5, 943-945.
- Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J.S., Mellman, I., **1999**, A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99, 189-198.
- Foster, K., Prowse, A., van den Berg, A., Fleming, S., Hulsbeek, M.M., Crossey, P.A., Richards, F.M., Cairns, P., Affara, N.A., Ferguson-Smith, M.A., et al., **1994**, Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* 3, 2169-2173.
- Francois, C., van Velthoven, R., De Lathouwer, O., Moreno, C., Peltier, A., Kaltner, H., Salmon, I., Gabius, H.J., Danguy, A., Decaestecker, C., Kiss, R., **1999**, Galectin-1 and galectin-3 binding pattern expression in renal cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 112, 194-203.
- Frank, M.H., Pomer, S., **1999**, Interferon alpha2b differentially affects proliferation of two human renal cell carcinoma cell lines differing in the P-glycoprotein-associated multidrug-resistant phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 117-120.
- Fujinaga, Y., Wolf, A.A., Rodighiero, C., Wheeler, H., Tsai, B., Allen, L., Jobling, M.G., Rapoport, T., Holmes, R.K., Lencer, W.I., **2003**, Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 14, 4783-4793.
- Fukasawa, K., **2005**, Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* 230, 6-19.
- Fukumori, T., Oka, N., Takenaka, Y., Nangia-Makker, P., Elsamman, E., Kasai, T., Shono, M., Kanayama, H.O., Ellerhorst, J., Lotan, R., Raz, A., **2006**, Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. *Cancer Res* 66, 3114-3119.
- Fullekrug, J., Simons, K., **2004**, Lipid rafts and apical membrane traffic. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 164-169.
- Furtak, V., Hatcher, F., Ochieng, J., **2001**, Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 845-850.

- Gao, X., Liu, D., Fan, Y., Li, X., Xue, H., Ma, Y., Zhou, Y., Tai, G., **2012**, The two endocytic pathways mediated by the carbohydrate recognition domain and regulated by the collagen-like domain of galectin-3 in vascular endothelial cells. *PLoS One* 7, e52430.
- Gaudin, J.C., Mehul, B., Hughes, R.C., **2000**, Nuclear localisation of wild type and mutant galectin-3 in transfected cells. *Biol Cell* 92, 49-58.
- Glebov, O.O., Bright, N.A., Nichols, B.J., **2006**, Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8, 46-54.
- Glinsky, V.V., Glinsky, G.V., Glinskii, O.V., Huxley, V.H., Turk, J.R., Mossine, V.V., Deutscher, S.L., Pienta, K.J., Quinn, T.P., **2003**, Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res* 63, 3805-3811.
- Glinsky, V.V., Glinsky, G.V., Rittenhouse-Olson, K., Huflejt, M.E., Glinskii, O.V., Deutscher, S.L., Quinn, T.P., **2001**, The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium. *Cancer Res* 61, 4851-4857.
- Gnarra, J.R., Duan, D.R., Weng, Y., Humphrey, J.S., Chen, D.Y., Lee, S., Pause, A., Dudley, C.F., Latif, F., Kuzmin, I., Schmidt, L., Duh, F.M., Stackhouse, T., Chen, F., Kishida, T., Wei, M.H., Lerman, M.I., Zbar, B., Klausner, R.D., Linehan, W.M., **1996**, Molecular cloning of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and its role in renal carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1242, 201-210.
- Gnarra, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F.M., et al., **1994**, Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7, 85-90.
- Goetz, J.G., Joshi, B., Lajoie, P., Strugnell, S.S., Scudamore, T., Kojic, L.D., Nabi, I.R., **2008**, Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J Cell Biol* 180, 1261-1275.
- Gonzalez, A., Rodriguez-Boulán, E., **2009**, Clathrin and AP1B: key roles in basolateral trafficking through trans-endosomal routes. *FEBS Lett* 583, 3784-3795.
- Gorlich, D., Mattaj, I.W., **1996**, Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271, 1513-1518.
- Grassadonia, A., Tinari, N., Iurisci, I., Piccolo, E., Cumashi, A., Innominato, P., D'Egidio, M., Natoli, C., Piantelli, M., Iacobelli, S., **2004**, 90K (Mac-2 BP)

- and galectins in tumor progression and metastasis. *Glycoconj J* 19, 551-556.
- Greb, C., **2011**, Proteinkomponenten und Transportwege an der apikalen Membran polarer Epithelzellen. *Dissertation*.
- Grone, H.J., Weber, K., Helmchen, U., Osborn, M., **1986**, Villin--a marker of brush border differentiation and cellular origin in human renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 124, 294-302.
- Gupta, D., Brewer, C.F., **1994**, Homogeneous aggregation of the 14-kDa beta-galactoside specific vertebrate lectin complex with asialofetuin in mixed systems. *Biochemistry* 33, 5526-5530.
- Gut, A., Balda, M.S., Matter, K., **1998**, The cytoplasmic domains of a beta1 integrin mediate polarization in Madin-Darby canine kidney cells by selective basolateral stabilization. *J Biol Chem* 273, 29381-29388.
- Hammarstrom, S., **1999**, The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 9, 67-81.
- Handa, K., Kreiger, N., **2002**, Diet patterns and the risk of renal cell carcinoma. *Public Health Nutr* 5, 757-767.
- Hansen, C.G., Nichols, B.J., **2009**, Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J Cell Sci* 122, 1713-1721.
- Hara-Kuge, S., Ohkura, T., Ideo, H., Shimada, O., Atsumi, S., Yamashita, K., **2002**, Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J Biol Chem* 277, 16332-16339.
- Harder, T., Engelhardt, K.R., **2004**, Membrane domains in lymphocytes - from lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic* 5, 265-275.
- Haudek, K.C., Spronk, K.J., Voss, P.G., Patterson, R.J., Wang, J.L., Arnoys, E.J., **2010**, Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochim Biophys Acta* 1800, 181-189.
- Hauri, H.P., Sterchi, E.E., Bienz, D., Fransen, J.A., Marxer, A., **1985**, Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 101, 838-851.
- Henkel, J.R., Gibson, G.A., Poland, P.A., Ellis, M.A., Hughey, R.P., Weisz, O.A., **2000**, Influenza M2 proton channel activity selectively inhibits trans-

- Golgi network release of apical membrane and secreted proteins in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 148, 495-504.
- Hikita, C., Vijayakumar, S., Takito, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Al-Awqati, Q., **2000**, Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J Cell Biol* 151, 1235-1246.
- Hittelet, A., Camby, I., Nagy, N., Legendre, H., Bronckart, Y., Decaestecker, C., Kaltner, H., Nifant'ev, N.E., Bovin, N.V., Pector, J.C., Salmon, I., Gabius, H.J., Kiss, R., Yeaton, P., **2003**, Binding sites for Lewis antigens are expressed by human colon cancer cells and negatively affect their migration. *Lab Invest* 83, 777-787.
- Ho, M.K., Springer, T.A., **1982**, Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 128, 1221-1228.
- Hood, J.D., Cheresch, D.A., **2002**, Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2, 91-100.
- Hsu, D.K., Chernyavsky, A.I., Chen, H.Y., Yu, L., Grando, S.A., Liu, F.T., **2009**, Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 129, 573-583.
- Hsu, D.K., Yang, R.Y., Liu, F.T., **2006**, Galectins in apoptosis. *Methods Enzymol* 417, 256-273.
- Hua, W., Sheff, D., Toomre, D., Mellman, I., **2006**, Vectorial insertion of apical and basolateral membrane proteins in polarized epithelial cells revealed by quantitative 3D live cell imaging. *J Cell Biol* 172, 1035-1044.
- Hughes, R.C., **2001**, Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83, 667-676.
- Huotari, J., Helenius, A., **2011**, Endosome maturation. *EMBO J* 30, 3481-3500.
- Iacobelli, S., Arno, E., D'Orazio, A., Coletti, G., **1986**, Detection of antigens recognized by a novel monoclonal antibody in tissue and serum from patients with breast cancer. *Cancer Res* 46, 3005-3010.
- Inohara, H., Akahani, S., Kohts, K., Raz, A., **1996**, Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Res* 56, 4530-4534.
- Inohara, H., Raz, A., **1995**, Functional evidence that cell surface galectin-3 mediates homotypic cell adhesion. *Cancer Res* 55, 3267-3271.

- Ito, K., Yoshii, H., Asakuma, J., Sato, A., Horiguchi, A., Sumitomo, M., Hayakawa, M., Asano, T., **2009**, Clinical impact of the presence of the worst nucleolar grade in renal cell carcinoma specimens. *Jpn J Clin Oncol* 39, 588-594.
- Ivanov, A.I., **2008**, Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 440, 15-33.
- Jacob, R., Alfalah, M., Grunberg, J., Obendorf, M., Naim, H.Y., **2000**, Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein. *J Biol Chem* 275, 6566-6572.
- Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M., Naim, H.Y., **2003**, Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr Biol* 13, 607-612.
- Jacob, R., Naim, H.Y., **2001**, Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr Biol* 11, 1444-1450.
- Jacob, R., Preuss, U., Panzer, P., Alfalah, M., Quack, S., Roth, M.G., Naim, H., Naim, H.Y., **1999**, Hierarchy of sorting signals in chimeras of intestinal lactase-phlorizin hydrolase and the influenza virus hemagglutinin. *J Biol Chem* 274, 8061-8067.
- Jacobson, K., Mouritsen, O.G., Anderson, R.G., **2007**, Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* 9, 7-14.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., Chao, M., **1986**, Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545-554.
- Jung, H., Seong, H.A., Ha, H., **2008**, Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of p53 activity. *J Biol Chem* 283, 20383-20396.
- Takehi, K., Oda, Y., Kinoshita, M., **2001**, Fluorescence polarization: analysis of carbohydrate-protein interaction. *Anal Biochem* 297, 111-116.
- Kammerer, R., Popp, T., Hartle, S., Singer, B.B., Zimmermann, W., **2007**, Species-specific evolution of immune receptor tyrosine based activation motif-containing CEACAM1-related immune receptors in the dog. *BMC Evol Biol* 7, 196.
- Kammerer, R., Riesenberger, R., Weiler, C., Lohrmann, J., Schleypen, J., Zimmermann, W., **2004**, The tumour suppressor gene CEACAM1 is

- completely but reversibly downregulated in renal cell carcinoma. *J Pathol* 204, 258-267.
- Karagiannis, T.C., El-Osta, A., **2005**, RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* 12, 787-795.
- Katagiri, A., Watanabe, R., Tomita, Y., **1995**, E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *Br J Cancer* 71, 376-379.
- Keller, C., Kroening, S., Zuehlke, J., Kunath, F., Krueger, B., Goppelt-Struebe, M., **2012**, Distinct mesenchymal alterations in N-cadherin and E-cadherin positive primary renal epithelial cells. *PLoS One* 7, e43584.
- Keller, P., Toomre, D., Diaz, E., White, J., Simons, K., **2001**, Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol* 3, 140-149.
- Kemler, R., **1993**, From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9, 317-321.
- Khaldoyanidi, S.K., Glinsky, V.V., Sikora, L., Glinskii, A.B., Mossine, V.V., Quinn, T.P., Glinsky, G.V., Sriramaraio, P., **2003**, MDA-MB-435 human breast carcinoma cell homo- and heterotypic adhesion under flow conditions is mediated in part by Thomsen-Friedenreich antigen-galectin-3 interactions. *J Biol Chem* 278, 4127-4134.
- Kilic, N., Oliveira-Ferrer, L., Wurmbach, J.H., Loges, S., Chalajour, F., Neshat-Vahid, S., Weil, J., Fernando, M., Ergun, S., **2005**, Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. *J Biol Chem* 280, 2361-2369.
- Kim, S.J., Choi, I.J., Cheong, T.C., Lee, S.J., Lotan, R., Park, S.H., Chun, K.H., **2010**, Galectin-3 increases gastric cancer cell motility by up-regulating fascin-1 expression. *Gastroenterology* 138, 1035-1045 e1031-1032.
- Kirshner, J., Chen, C.J., Liu, P., Huang, J., Shively, J.E., **2003**, CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 521-526.
- Kobayashi, T., Shimura, T., Yajima, T., Kubo, N., Araki, K., Tsutsumi, S., Suzuki, H., Kuwano, H., Raz, A., **2011**, Transient gene silencing of galectin-3 suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of beta-catenin. *Int J Cancer* 129, 2775-2786.

- Koch, A., Poirier, F., Jacob, R., Delacour, D., **2010**, Galectin-3, a novel centrosome-associated protein, required for epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell* 21, 219-231.
- Kokkonen, N., Rivinoja, A., Kauppila, A., Suokas, M., Kellokumpu, I., Kellokumpu, S., **2004**, Defective acidification of intracellular organelles results in aberrant secretion of cathepsin D in cancer cells. *J Biol Chem* 279, 39982-39988.
- Koths, K., Taylor, E., Halenbeck, R., Casipit, C., Wang, A., **1993**, Cloning and characterization of a human Mac-2-binding protein, a new member of the superfamily defined by the macrophage scavenger receptor cysteine-rich domain. *J Biol Chem* 268, 14245-14249.
- Kovacikova, J., Winter, C., Loffing-Cueni, D., Loffing, J., Finberg, K.E., Lifton, R.P., Hummler, E., Rossier, B., Wagner, C.A., **2006**, The connecting tubule is the main site of the furosemide-induced urinary acidification by the vacuolar H⁺-ATPase. *Kidney Int* 70, 1706-1716.
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., Rodriguez-Boulant, E., **2000**, Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol* 2, 125-127.
- Kundu, A., Avalos, R.T., Sanderson, C.M., Nayak, D.P., **1996**, Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol* 70, 6508-6515.
- Kurzchalia, T.V., Dupree, P., Parton, R.G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M., Simons, K., **1992**, VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 118, 1003-1014.
- Ladinsky, M.S., Wu, C.C., McIntosh, S., McIntosh, J.R., Howell, K.E., **2002**, Structure of the Golgi and distribution of reporter molecules at 20 degrees C reveals the complexity of the exit compartments. *Mol Biol Cell* 13, 2810-2825.
- Laemmli, U.K., **1970**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laoukili, J., Perret, E., Middendorp, S., Houcine, O., Guennou, C., Marano, F., Bornens, M., Tournier, F., **2000**, Differential expression and cellular distribution of centrin isoforms during human ciliated cell differentiation in vitro. *J Cell Sci* 113 (Pt 8), 1355-1364.
- Lapierre, L.A., Ducharme, N.A., Drake, K.R., Goldenring, J.R., Kenworthy, A.K., **2012**, Coordinated regulation of caveolin-1 and Rab11a in apical

- recycling compartments of polarized epithelial cells. *Exp Cell Res* 318, 103-113.
- Lau, K.S., Partridge, E.A., Grigorian, A., Silvescu, C.I., Reinhold, V.N., Demetriou, M., Dennis, J.W., **2007**, Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* 129, 123-134.
- Le Bivic, A., Garcia, M., Rodriguez-Boulan, E., **1993**, Ricin-resistant Madin-Darby canine kidney cells missort a major endogenous apical sialoglycoprotein. *J Biol Chem* 268, 6909-6916.
- Le Bivic, A., Sambuy, Y., Patzak, A., Patil, N., Chao, M., Rodriguez-Boulan, E., **1991**, An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J Cell Biol* 115, 607-618.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., Poirier, F., **2004**, Introduction to galectins. *Glycoconj J* 19, 433-440.
- Legendre, H., Decaestecker, C., Nagy, N., Hendlisch, A., Schuring, M.P., Salmon, I., Gabius, H.J., Pector, J.C., Kiss, R., **2003**, Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers. *Mod Pathol* 16, 491-504.
- Lepur, A., Carlsson, M.C., Novak, R., Dunic, J., Nilsson, U.J., Leffler, H., **2012a**, Galectin-3 endocytosis by carbohydrate independent and dependent pathways in different macrophage like cell types. *Biochim Biophys Acta* 1820, 804-818.
- Lepur, A., Salomonsson, E., Nilsson, U.J., Leffler, H., **2012b**, Ligand induced galectin-3 protein self-association. *J Biol Chem* 287, 21751-21756.
- Lin, S., Naim, H.Y., Rodriguez, A.C., Roth, M.G., **1998**, Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol* 142, 51-57.
- Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S.H., Mostov, K.E., Leffler, H., **1993**, Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J Biol Chem* 268, 11750-11757.
- Lisanti, M.P., Caras, I.W., Davitz, M.A., Rodriguez-Boulan, E., **1989a**, A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 109, 2145-2156.

- Lisanti, M.P., Le Bivic, A., Sargiacomo, M., Rodriguez-Boulan, E., **1989b**, Steady-state distribution and biogenesis of endogenous Madin-Darby canine kidney glycoproteins: evidence for intracellular sorting and polarized cell surface delivery. *J Cell Biol* 109, 2117-2127.
- Liu, F.T., Rabinovich, G.A., **2005**, Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 29-41.
- Lock, J.G., Stow, J.L., **2005**, Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 16, 1744-1755.
- Lodish, **2008**, Molecular Cell Biology. 801-846.
- Lotz, M.M., Andrews, C.W., Jr., Korzeliuss, C.A., Lee, E.C., Steele, G.D., Jr., Clarke, A., Mercurio, A.M., **1993**, Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3466-3470.
- Lukyanov, P., Furtak, V., Ochieng, J., **2005**, Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1031-1036.
- Lutz, M.S., Burk, R.D., **2006**, Primary cilium formation requires von hippel-lindau gene function in renal-derived cells. *Cancer Res* 66, 6903-6907.
- Lutz, N.W., Franks, S.E., Frank, M.H., Pomer, S., Hull, W.E., **2005**, Investigation of multidrug resistance in cultured human renal cell carcinoma cells by ³¹P-NMR spectroscopy and treatment survival assays. *MAGMA* 18, 144-161.
- Mackay, B., Ordonez, N.G., Khoursand, J., Bennington, J.L., **1987**, The ultrastructure and immunocytochemistry of renal cell carcinoma. *Ultrastruct Pathol* 11, 483-502.
- Madej, A., Puzianowska-Kuznicka, M., Tanski, Z., Nauman, J., Nauman, A., **2003**, Vitamin D receptor binding to DNA is altered without the change in its expression in human renal clear cell cancer. *Nephron Exp Nephrol* 93, e150-157.
- Madin, S.H., Andriese, P.C., Darby, N.B., **1957**, The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals. *Am J Vet Res* 18, 932-941.
- Maher, E.R., Yates, J.R., Harries, R., Benjamin, C., Harris, R., Moore, A.T., Ferguson-Smith, M.A., **1990**, Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med* 77, 1151-1163.

- Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W.F., Subramani, S., **2010**, Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J Cell Biol* 188, 537-546.
- Mans, D.A., Voest, E.E., Giles, R.H., **2008**, All along the watchtower: is the cilium a tumor suppressor organelle? *Biochim Biophys Acta* 1786, 114-125.
- Mareel, M., Vleminckx, K., Vermeulen, S., Bracke, M., Van Roy, F., **1992**, E-cadherin expression: a counterbalance for cancer cell invasion. *Bull Cancer* 79, 347-355.
- Margadant, C., Monsuur, H.N., Norman, J.C., Sonnenberg, A., **2011**, Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 23, 607-614.
- Markel, G., Lieberman, N., Katz, G., Arnon, T.I., Lotem, M., Drize, O., Blumberg, R.S., Bar-Haim, E., Mader, R., Eisenbach, L., Mandelboim, O., **2002**, CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J Immunol* 168, 2803-2810.
- Martin-Belmonte, F., Arvan, P., Alonso, M.A., **2001**, MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 276, 49337-49342.
- Matera, A.G., **1999**, Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* 9, 302-309.
- Matlin, K.S., **1986**, Ammonium chloride slows transport of the influenza virus hemagglutinin but does not cause mis-sorting in a polarized epithelial cell line. *J Biol Chem* 261, 15172-15178.
- Maxfield, F.R., **1982**, Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J Cell Biol* 95, 676-681.
- Mays, R.W., Nelson, W.J., Marrs, J.A., **1995**, Generation of epithelial cell polarity: roles for protein trafficking, membrane-cytoskeleton, and E-cadherin-mediated cell adhesion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 763-773.
- Mehul, B., Bawumia, S., Martin, S.R., Hughes, R.C., **1994**, Structure of baby hamster kidney carbohydrate-binding protein CBP30, an S-type animal lectin. *J Biol Chem* 269, 18250-18258.

- Mehul, B., Hughes, R.C., **1997**, Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci* 110 (Pt 10), 1169-1178.
- Mellman, I., Nelson, W.J., **2008**, Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 833-845.
- Menon, R.P., Hughes, R.C., **1999**, Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur J Biochem* 264, 569-576.
- Merseburger, A.S., Kramer, M.W., Hennenlotter, J., Serth, J., Kruck, S., Gracia, A., Stenzl, A., Kuczyk, M.A., **2008a**, Loss of galectin-3 expression correlates with clear cell renal carcinoma progression and reduced survival. *World J Urol* 26, 637-642.
- Merseburger, A.S., Kramer, M.W., Hennenlotter, J., Simon, P., Knapp, J., Hartmann, J.T., Stenzl, A., Serth, J., Kuczyk, M.A., **2008b**, Involvement of decreased Galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer. *Prostate* 68, 72-77.
- Meyer-Siegler, K.L., Iczkowski, K.A., Vera, P.L., **2006**, Macrophage migration inhibitory factor is increased in the urine of patients with urinary tract infection: macrophage migration inhibitory factor-protein complexes in human urine. *J Urol* 175, 1523-1528.
- Mishra, R., Grzybek, M., Niki, T., Hirashima, M., Simons, K., **2010**, Galectin-9 trafficking regulates apical-basal polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17633-17638.
- Mitchell, R.A., Bucala, R., **2000**, Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol* 10, 359-366.
- Mo, D., Costa, S.A., Ihrke, G., Youker, R.T., Pastor-Soler, N., Hughey, R.P., Weisz, O.A., **2012**, Sialylation of N-linked glycans mediates apical delivery of endolyn in MDCK cells via a galectin-9-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 23, 3636-3646.
- Mostov, K.E., **1994**, Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 12, 63-84.
- Moutsatsos, I.K., Wade, M., Schindler, M., Wang, J.L., **1987**, Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6452-6456.

- Murphy, R.F., Powers, S., Cantor, C.R., **1984**, Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH 6. *J Cell Biol* 98, 1757-1762.
- Nakahara, S., Hogan, V., Inohara, H., Raz, A., **2006**, Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. *J Biol Chem* 281, 39649-39659.
- Nakahara, S., Oka, N., Raz, A., **2005**, On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 10, 267-275.
- Nakahara, S., Raz, A., **2007**, Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Metastasis Rev* 26, 605-610.
- Natoli, C., Dianzani, F., Mazzotta, F., Balocchi, E., Pierotti, P., Antonelli, G., Iacobelli, S., **1993**, 90K protein: a new predictor marker of disease progression in human immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6, 370-375.
- Nauli, S.M., Zhou, J., **2004**, Polycystins and mechanosensation in renal and nodal cilia. *Bioessays* 26, 844-856.
- Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P., Wagener, C., **1993**, Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10744-10748.
- Nezil, F.A., Bloom, M., **1992**, Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes. *Biophys J* 61, 1176-1183.
- Nickel, W., **2005**, Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6, 607-614.
- Nieminen, J., Kuno, A., Hirabayashi, J., Sato, S., **2007**, Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 282, 1374-1383.
- Nigg, E.A., **2006**, Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer* 119, 2717-2723.
- Nio, J., Takahashi-Iwanaga, H., Morimatsu, M., Kon, Y., Iwanaga, T., **2006**, Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of galectin-3, a beta-galactoside binding lectin, in the urinary system of adult mice. *Histochem Cell Biol* 126, 45-56.

- Nittka, S., Gunther, J., Ebisch, C., Erbersdobler, A., Neumaier, M., **2004**, The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 23, 9306-9313.
- Nouwen, E.J., Dauwe, S., van der Biest, I., De Broe, M.E., **1993**, Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney. *Kidney Int* 44, 147-158.
- O'Driscoll, L., Linehan, R., Liang, Y.H., Joyce, H., Oglesby, I., Clynes, M., **2002**, Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), in vitro. *Anticancer Res* 22, 3117-3125.
- Ochieng, J., Furtak, V., Lukyanov, P., **2004**, Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 19, 527-535.
- Oikawa, S., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Kosaki, G., Nakazato, H., **1992**, Homotypic and heterotypic Ca(++)-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 881-887.
- Oka, N., Takenaka, Y., Raz, A., **2004**, Galectins and urological cancer. *J Cell Biochem* 91, 118-124.
- Openo, K.P., Kadrofske, M.M., Patterson, R.J., Wang, J.L., **2000**, Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 255, 278-290.
- Owen, D.M., Rentero, C., Magenau, A., Abu-Siniyeh, A., Gaus, K., **2012**, Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat Protoc* 7, 24-35.
- Pace, K.E., Lee, C., Stewart, P.L., Baum, L.G., **1999**, Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* 163, 3801-3811.
- Paladino, S., Pocard, T., Catino, M.A., Zurzolo, C., **2006**, GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 172, 1023-1034.
- Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., Zurzolo, C., **2004**, Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* 167, 699-709.
- Pante, N., Aebi, U., **1996**, Sequential binding of import ligands to distinct nucleopore regions during their nuclear import. *Science* 273, 1729-1732.

- Parczyk, K., Haase, W., Kondor-Koch, C., **1989**, Microtubules are involved in the secretion of proteins at the apical cell surface of the polarized epithelial cell, Madin-Darby canine kidney. *J Biol Chem* 264, 16837-16846.
- Parczyk, K., Koch-Brandt, C., **1991**, The role of carbohydrates in vectorial exocytosis. The secretion of the gp 80 glycoprotein complex in a ricin-resistant mutant of MDCK cells. *FEBS Lett* 278, 267-270.
- Parczyk, K., Kondor-Koch, C., **1989**, The influence of pH on the vesicular traffic to the surface of the polarized epithelial cell, MDCK. *Eur J Cell Biol* 48, 353-359.
- Partridge, E.A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G.M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I.R., Wrana, J.L., Dennis, J.W., **2004**, Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 306, 120-124.
- Perret, E., Lakkaraju, A., Deborde, S., Schreiner, R., Rodriguez-Boulan, E., **2005**, Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr Opin Cell Biol* 17, 423-434.
- Petruzzelli, L., Takami, M., Humes, H.D., **1999**, Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 106, 467-476.
- Piepenhagen, P.A., Nelson, W.J., **1993**, Defining E-cadherin-associated protein complexes in epithelial cells: plakoglobin, beta- and gamma-catenin are distinct components. *J Cell Sci* 104 (Pt 3), 751-762.
- Pilarsky, C., Koch-Brandt, C., **1992**, Acidification slows the transport but does not influence the polarity of secretion of gp80 in the polarized epithelial cell MDCK. *Eur J Cell Biol* 59, 275-279.
- Poland, P.A., Rondanino, C., Kinlough, C.L., Heimbürg-Molinaro, J., Arthur, C.M., Stowell, S.R., Smith, D.F., Hughey, R.P., **2011**, Identification and characterization of endogenous galectins expressed in Madin Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 286, 6780-6790.
- Poon, S., Rybchyn, M.S., Easterbrook-Smith, S.B., Carver, J.A., Pankhurst, G.J., Wilson, M.R., **2002**, Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin. *J Biol Chem* 277, 39532-39540.
- Prall, F., Nollau, P., Neumaier, M., Haubeck, H.D., Drzeniek, Z., Helmchen, U., Loning, T., Wagener, C., **1996**, CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium,

- endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 44, 35-41.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K., Horber, J.K., **2000**, Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 148, 997-1008.
- Riethdorf, L., Lisboa, B.W., Henkel, U., Naumann, M., Wagener, C., Loning, T., **1997**, Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, and malignant lesions of the human mammary gland. *J Histochem Cytochem* 45, 957-963.
- Robine, S., Huet, C., Moll, R., Sahuquillo-Merino, C., Coudrier, E., Zweibaum, A., Louvard, D., **1985**, Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells? *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8488-8492.
- Rodriguez-Boulán, E., Kreitzer, G., Musch, A., **2005**, Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 233-247.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., Scott, M.P., **2007**, Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317, 372-376.
- Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., **2002**, Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 813-825.
- Ross, M.H., **2003**, Histology, a text and atlas. 602-642.
- Ross, M.H., **2007**, Histology, a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. *Lippincott Williams & Wilkins*.
- Sakaki, M., Fukumori, T., Fukawa, T., Elsamman, E., Shiirevnyamba, A., Nakatsuji, H., Kanayama, H.O., **2010**, Clinical significance of Galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma. *J Med Invest* 57, 152-157.
- Salisbury, J.L., **2007**, A mechanistic view on the evolutionary origin for centrin-based control of centriole duplication. *J Cell Physiol* 213, 420-428.
- Salomonsson, E., Carlsson, M.C., Osla, V., Hendus-Altenburger, R., Kahl-Knutson, B., Oberg, C.T., Sundin, A., Nilsson, R., Nordberg-Karlsson, E., Nilsson, U.J., Karlsson, A., Rini, J.M., Leffler, H., **2010**, Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. *J Biol Chem* 285, 35079-35091.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.P., und Russel, D.W., **2001**, Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 3.

- Saraboji, K., Hakansson, M., Genheden, S., Diehl, C., Qvist, J., Weininger, U., Nilsson, U.J., Leffler, H., Ryde, U., Akke, M., Logan, D.T., **2012**, The carbohydrate-binding site in galectin-3 is preorganized to recognize a sugarlike framework of oxygens: ultra-high-resolution structures and water dynamics. *Biochemistry* 51, 296-306.
- Sarnataro, D., Paladino, S., Campana, V., Grassi, J., Nitsch, L., Zurzolo, C., **2002**, PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic* 3, 810-821.
- Schneider, D., **2011**, Unkonventionelle Sekretion und Endozytose von Galectin-3. *Dissertation*.
- Schneider, D., Greb, C., Koch, A., Straube, T., Elli, A., Delacour, D., Jacob, R., **2010**, Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *Eur J Cell Biol* 89, 788-798.
- Schraml, P., Frew, I.J., Thoma, C.R., Boysen, G., Struckmann, K., Krek, W., Moch, H., **2009**, Sporadic clear cell renal cell carcinoma but not the papillary type is characterized by severely reduced frequency of primary cilia. *Mod Pathol* 22, 31-36.
- Schuck, S., Simons, K., **2004**, Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* 117, 5955-5964.
- Seetharaman, J., Kanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S.H., Rini, J.M., **1998**, X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem* 273, 13047-13052.
- Shimazui, T., Bringuier, P.P., van Berkel, H., Ruijter, E., Akaza, H., Debruyne, F.M., Oosterwijk, E., Schalken, J.A., **1997**, Decreased expression of alpha-catenin is associated with poor prognosis of patients with localized renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 74, 523-528.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Fukumori, T., Tsutsumi, S., Okada, K., Hogan, V., Kikuchi, A., Kuwano, H., Raz, A., **2005**, Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res* 65, 3535-3537.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Tsutsumi, S., Hogan, V., Kikuchi, A., Raz, A., **2004**, Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res* 64, 6363-6367.
- Sienel, W., Dango, S., Woelfle, U., Morresi-Hauf, A., Wagener, C., Brummer, J., Mutschler, W., Passlick, B., Pantel, K., **2003**, Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes

- progression of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 9, 2260-2266.
- Simons, K., Ikonen, E., **1997**, Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., Wandinger-Ness, A., **1990**, Polarized sorting in epithelia. *Cell* 62, 207-210.
- Singla, V., Reiter, J.F., **2006**, The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313, 629-633.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S.D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J.K., Gazdar, A.F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B.H., Bachman, K.E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., **2006**, The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-274.
- Skubitz, K.M., Ducker, T.P., Goueli, S.A., **1992**, CD66 monoclonal antibodies recognize a phosphotyrosine-containing protein bearing a carcinoembryonic antigen cross-reacting antigen on the surface of human neutrophils. *J Immunol* 148, 852-860.
- Song, S., Byrd, J.C., Mazurek, N., Liu, K., Koo, J.S., Bresalier, R.S., **2005**, Galectin-3 modulates MUC2 mucin expression in human colon cancer cells at the level of transcription via AP-1 activation. *Gastroenterology* 129, 1581-1591.
- Song, S., Mazurek, N., Liu, C., Sun, Y., Ding, Q.Q., Liu, K., Hung, M.C., Bresalier, R.S., **2009**, Galectin-3 mediates nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signaling in human colon cancer cells by regulation of glycogen synthase kinase-3 β activity. *Cancer Res* 69, 1343-1349.
- Sparrow, C.P., Leffler, H., Barondes, S.H., **1987**, Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *J Biol Chem* 262, 7383-7390.
- Spector, D.L., **2001**, Nuclear domains. *J Cell Sci* 114, 2891-2893.
- Stechly, L., Morelle, W., Dessein, A.F., Andre, S., Grard, G., Trinel, D., Dejonghe, M.J., Leteurtre, E., Drobecq, H., Trugnan, G., Gabius, H.J., Huet, G., **2009**, Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic* 10, 438-450.

- Storkel, S., **1999**, [Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation]. *Urologe A* 38, 425-432.
- Straube, T., **2009**, Zelluläre und gewebespezifische Verteilung von Galectin-3 in der Niere. *Diplomarbeit*.
- Straube, T., von Mach, T., Honig, E., Greb, C., Schneider, D., Jacob, R., **2013**, PH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells. *Traffic*.
- Sundberg, U., Beauchemin, N., Obrink, B., **2004**, The cytoplasmic domain of CEACAM1-L controls its lateral localization and the organization of desmosomes in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 117, 1091-1104.
- Svenberg, T., **1976**, Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int J Cancer* 17, 588-596.
- Syrjanen, K., Hjelt, L., **1978**, Grading of human renal adenocarcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 12, 49-55.
- Takata, K., Matsuzaki, T., Tajika, Y., Ablimit, A., Hasegawa, T., **2008**, Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem Cell Biol* 130, 197-209.
- Takenaka, Y., Fukumori, T., Yoshii, T., Oka, N., Inohara, H., Kim, H.R., Bresalier, R.S., Raz, A., **2004**, Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol* 24, 4395-4406.
- Talamini, R., Baron, A.E., Barra, S., Bidoli, E., La Vecchia, C., Negri, E., Serraino, D., Franceschi, S., **1990**, A case-control study of risk factor for renal cell cancer in northern Italy. *Cancer Causes Control* 1, 125-131.
- Tani, T., Laitinen, L., Kangas, L., Lehto, V.P., Virtanen, I., **1995**, Expression of E- and N-cadherin in renal cell carcinomas, in renal cell carcinoma cell lines in vitro and in their xenografts. *Int J Cancer* 64, 407-414.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., Amigorena, S., **2001**, Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166, 7309-7318.
- Thies, A., Moll, I., Berger, J., Wagener, C., Brummer, J., Schulze, H.J., Brunner, G., Schumacher, U., **2002**, CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol* 20, 2530-2536.

- Thoenes, W., Rumpelt, H.J., Storkel, S., **1990**, [Classification of renal cell carcinoma/tumors and their relationship to the nephron-collecting tubules system]. *Klin Wochenschr* 68, 1102-1111.
- Thoenes, W., Storkel, S., Rumpelt, H.J., Jacobi, G.H., **1986**, [Renal cell carcinoma--a classification based on cytomorphological criteria]. *Zentralbl Allg Pathol* 132, 503-513.
- Thoma, C.R., Frew, I.J., Hoerner, C.R., Montani, M., Moch, H., Krek, W., **2007**, pVHL and GSK3beta are components of a primary cilium-maintenance signalling network. *Nat Cell Biol* 9, 588-595.
- Tilki, D., Singer, B.B., Shariat, S.F., Behrend, A., Fernando, M., Irmak, S., Buchner, A., Hooper, A.T., Stief, C.G., Reich, O., Ergun, S., **2010**, CEACAM1: a novel urinary marker for bladder cancer detection. *Eur Urol* 57, 648-654.
- Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M., **2001**, Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 285-293.
- Ullrich, A., Sures, I., D'Egidio, M., Jallal, B., Powell, T.J., Herbst, R., Dreps, A., Azam, M., Rubinstein, M., Natoli, C., et al., **1994**, The secreted tumor-associated antigen 90K is a potent immune stimulator. *J Biol Chem* 269, 18401-18407.
- Urban, J., Parczyk, K., Leutz, A., Kayne, M., Kondor-Koch, C., **1987**, Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line. *J Cell Biol* 105, 2735-2743.
- Vagin, O., Kraut, J.A., Sachs, G., **2009**, Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F459-469.
- van den Brule, F., Califice, S., Castronovo, V., **2004**, Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 19, 537-542.
- van den Brule, F.A., Buicu, C., Berchuck, A., Bast, R.C., Deprez, M., Liu, F.T., Cooper, D.N., Pieters, C., Sobel, M.E., Castronovo, V., **1996**, Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. *Hum Pathol* 27, 1185-1191.
- van den Brule, F.A., Waltregny, D., Liu, F.T., Castronovo, V., **2000**, Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int J Cancer* 89, 361-367.

- van Meer, G., Simons, K., **1988**, Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 36, 51-58.
- Verkade, P., Harder, T., Lafont, F., Simons, K., **2000**, Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 148, 727-739.
- Vila, M.R., Nicolas, A., Morote, J., de, I., Meseguer, A., **2000**, Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in renal cell carcinoma identified by RNA-based, arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Cancer* 89, 152-164.
- Waalkes, S., Merseburger, A.S., Simon, A., Serth, J., Kuczyk, M.A., **2010**, [Galectin expression in urological cancer. Diagnostic, prognostic and therapeutic potential]. *Urologe A* 49, 387-391.
- Waguri, S., Tomiyama, Y., Ikeda, H., Hida, T., Sakai, N., Taniike, M., Ebisu, S., Uchiyama, Y., **2006**, The luminal domain participates in the endosomal trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Exp Cell Res* 312, 4090-4107.
- Wang, J.L., Sun, S.Z., Qu, X., Liu, W.J., Wang, Y.Y., Lv, C.X., Sun, J.Z., Ma, R., **2011**, Clinicopathological significance of CEACAM1 gene expression in breast cancer. *Chin J Physiol* 54, 332-338.
- Wang, S., Luo, Y., Wilson, P.D., Witman, G.B., Zhou, J., **2004**, The autosomal recessive polycystic kidney disease protein is localized to primary cilia, with concentration in the basal body area. *J Am Soc Nephrol* 15, 592-602.
- Warfield, P.R., Makker, P.N., Raz, A., Ochieng, J., **1997**, Adhesion of human breast carcinoma to extracellular matrix proteins is modulated by galectin-3. *Invasion Metastasis* 17, 101-112.
- Wehrle-Haller, B., Imhof, B.A., **2001**, Stem cell factor presentation to c-Kit. Identification of a basolateral targeting domain. *J Biol Chem* 276, 12667-12674.
- Weisz, O.A., Rodriguez-Boulán, E., **2009**, Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J Cell Sci* 122, 4253-4266.
- Welsch, **2003**, Lehrbuch Histologie. 405-427.
- Wendland, M., Waheed, A., von Figura, K., Pohlmann, R., **1991**, Mr 46,000 mannose 6-phosphate receptor. The role of histidine and arginine residues for binding of ligand. *J Biol Chem* 266, 2917-2923.

- White, J., Kielian, M., Helenius, A., **1983**, Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Q Rev Biophys* 16, 151-195.
- Winyard, P.J., Bao, Q., Hughes, R.C., Woolf, A.S., **1997**, Epithelial galectin-3 during human nephrogenesis and childhood cystic diseases. *J Am Soc Nephrol* 8, 1647-1657.
- Wolf, A.A., Fujinaga, Y., Lencer, W.I., **2002**, Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *J Biol Chem* 277, 16249-16256.
- Wolf, A.A., Jobling, M.G., Wimer-Mackin, S., Ferguson-Maltzman, M., Madara, J.L., Holmes, R.K., Lencer, W.I., **1998**, Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *J Cell Biol* 141, 917-927.
- Yamashiro, D.J., Maxfield, F.R., **1987**, Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* 105, 2723-2733.
- Yang, R.Y., Hill, P.N., Hsu, D.K., Liu, F.T., **1998**, Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3. *Biochemistry* 37, 4086-4092.
- Yang, R.Y., Rabinovich, G.A., Liu, F.T., **2008**, Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 10, e17.
- Yeaman, C., Le Gall, A.H., Baldwin, A.N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., Rodriguez-Boulan, E., **1997**, The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 139, 929-940.
- Young, A.N., Amin, M.B., Moreno, C.S., Lim, S.D., Cohen, C., Petros, J.A., Marshall, F.F., Neish, A.S., **2001**, Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am J Pathol* 158, 1639-1651.
- Yu, J., Fischman, D.A., Steck, T.L., **1973**, Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct* 1, 233-248.
- Yu, M.C., Mack, T.M., Hanisch, R., Cicioni, C., Henderson, B.E., **1986**, Cigarette smoking, obesity, diuretic use, and coffee consumption as risk factors for renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 77, 351-356.

- Zhao, Q., Barclay, M., Hilkens, J., Guo, X., Barrow, H., Rhodes, J.M., Yu, L.G., **2010**, Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. *Mol Cancer* 9, 154.
- Zink, S., Grosse, L., Freikamp, A., Banfer, S., Muksch, F., Jacob, R., **2012**, Tubulin detyrosination promotes monolayer formation and apical trafficking in epithelial cells. *J Cell Sci* 125, 5998-6008.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

2.1	Aufbau einer Epithelzelle	14
2.2	Modell zur apikalen Sortierung <i>lipid raft</i> abhängiger und <i>lipid raft</i> unabhängiger Proteine	19
2.3	Transportwege in polaren Zellen (vereinfachte Darstellung)	21
2.4	Endozytosemechanismen und endosomale Kompartimente	25
2.5	Mitglieder der Galectin-Familie	27
2.6	Wege der unkonventionellen Sekretion	29
2.7	Aufbau des renalen Tubulussystems	32
2.8	Die verschiedenen Nierenzellkarzinome und ihr Ursprung im Tubulussystem	36
3.1	Kultivierung von MDCK II Zellen auf PET-Filtern	52
3.2	Aufbau Western-Blot	59
3.3	Fluoreszenzpolarisation	73
3.4	Membranfraktionierung und DRM Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation	78
3.5	Probenentnahme nach Nephrektomie	82
3.6	Jablonski-Diagramm zur Darstellung der GSDIM-Methode	91
4.1	Graphische Darstellung der Häufigkeit (in %) der Tumorarten von 101 untersuchten Patienten mit Nierenzellkarzinomen	96
4.2	Repräsentative HE- und Azan-Färbungen von humanem Nierengewebe	98
4.3	Ultrastruktur der Niere und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms	100
4.4	Lokalisation von Galectin-3 und apikalen sowie basolateralen Polaritätsmarkern im gesunden Nierengewebe und in klarzelligen Nierenzellkarzinomen	102
4.5	Expressionsverhalten von Galectin-3, Villin und E-Cadherin in klarzelligem Nierenzellkarzinom im Vergleich zu normalem Nierengewebe	104

4.6	Expressionsverhalten von β -Catenin, GAPDH und α -Tubulin in klarzelligen Nierenzellkarzinomen	106
4.7	Lokalisation von Galectin-3, E-Cadherin und Villin während der Zelldifferenzierung von RC-124 und RCC-FG1	109
4.8	Expressionsverhalten von Galectin-3 und E-Cadherin in RC-124 und RCC-FG1 Zellen	110
4.9	Nukleäre Lokalisation von Galectin-3 in Normal- und Tumorgewebe	112
4.10	Darstellung der Komponenten des Basalkörperchens mit Hilfe der GSDIM-Mikroskopie im Vergleich zur KLSM-Mikroskopie	114
4.11	Kolokalisation von Centrin-2 und Galectin-3 am Basalkörperchen des primären Ziliums in Nierenzellen	116
4.12	Expressionsverhalten von Galectin-3 und CEACAM1 während der Tumorprogression	118
4.13	Die Expression von Galectin-3 und CEACAM1 unter dem Einfluss der Tumordifferenzierung.	120
4.14	Galectin-3 und CEACAM1 im Übergangsgewebe	123
4.15	Identifikation der proteinhaltigen Elutionsfraktionen	125
4.16	Recycling von endozytiertem Galectin-3	130
4.17	Flotillin-1 abhängige Endozytose von Galectin-3	132
4.18	Galectin-3 wechselt zwischen einem DRM-assoziierten und nicht-assoziierten Status	135
4.19	Aufnahme von Galectin-3-pHrodo nach endosomaler Neutralisation	136
4.20	pH-abhängiger Wechsel von Galectin-3 zwischen einem DRM-assoziierten und nicht-assoziierten Status	138
4.21	pH-abhängige Aufnahme von rekombinantem Galectin-3	140
4.22	Einfluss des pH Wertes auf die Endozytose von Galectin-3, Galectin-3- Δ N und Cholera toxin Untereinheit B	142
4.23	Rekombinantes Galectin-3 stellt die apikale Sortierung von p75-GFP nach Galectin-3 <i>knock down</i> wieder her	144
4.24	Reduktion der Fluoreszenzintensität von pHrodo durch Anwesenheit von NH_4Cl	148
4.25	Die Menge an apikal sezerniertem gp80 wird durch den endosomalen pH beeinflusst	150

4.26	Die relative Menge an sekretiertem gp80 wird erst durch 50 mM NH ₄ Cl mit 50 mM Lactose merklich beeinflusst	151
4.27	Oberflächenexpression von p75GFP und CD29 nach endosomaler Neutralisation und Lactosebehandlung	153
4.28	pH-unabhängige Bindung von Galectin-3 an Lactosylsepharosebeads	156
4.29	pH-abhängige Bindungskurve von Galectin-3 mit FucLac und A-Tetra	157
4.30	pH-Wert abhängige Oligomerisation und C-Terminus vermittelte Selbstassoziation von Galectin-3	160
5.1	Modell der Endozytose und Rezyklierung von Galectin-3	191

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEE	Frühes apikales Endosom (<i>apical early endosome</i>)
AQP2	Aquaporin-2
ARE	Apikales Recycling Endosom (<i>apical recycling endosome</i>)
BEE	Frühes basolaterales Endosom (<i>basolateral early endosome</i>)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
β-Cat	Beta-Catenin
Cav1	Caveolin-1
CCP	Clathrin ummanteltes Vesikel (<i>clathrin coated pit</i>)
CoIP	Coimmunpräzipitation
CRD	Kohlenhydraterkennungsdomäne (<i>carbohydrate recognition domain</i>)
CRE	Gemeinsames Recycling Endosom (<i>common recycling endosome</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRM	Detergenz-resistente Membran (<i>detergent-resistant membrane</i>)
DT	Distaler Tubulus
DTT	Dithiolthreitol
E-Cadh	E-Cadherin
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglycerintetraacetat
EPSP	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfon Säure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	(<i>et alteris</i>) und andere
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>

Gal-3	Galectin-3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSDIM	<i>Ground state depletion microscopy followed by individual molecule return</i>
HA	Hämagglutinin
HE	Hämatoxilin Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HRP	Merrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IFT	Intraflagellärer Transport
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
KLMS	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
Laser	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
M	Molar (mol/l)
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium Eagle</i>
MIF	Makrophagen Inhibitions Faktor
mk	monoklonal
MT	Mikrotubuli
NA	Neuraminidase
P75 ^{NTR}	Neurotrophinrezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Proteinase-Inhibitor
pk	polyklonal

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Post-nukleärer Überstand (<i>post-nuclear supernatant</i>)
PT	Proximaler Tubulus
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SI	Saccharase-Isomaltase
siRNA	kurze interferierende RNA (<i>small interfering RNA</i>)
SR	Sammelrohr
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tfn-R	Transferrinrezeptor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TTF-1	Thyroid-spezifischer Transkriptionsfaktor
VHL	Von-Hippel-Lindau
v/v	<i>volume in volume</i>
w/v	<i>weight in volume</i>
WT	Wildtyp
z.o.	<i>Zonula occludens</i>

7.3 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden oder werden in folgenden Artikeln publiziert:

Straube T., Greb C., Hönig E., von Mach T., Schneider D. und Jacob R. (2013). **PH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells.** *Traffic*

Von Mach T., Carlsson MC., Straube T., Nilsson U., Leffler H. und Jacob R. (2013). **Ligand-binding and complex formation of galectin-3 is modulated by pH variations.** *Biochemical Journal*

Straube T., Reeh M., Hegele A., Elsässer HP. und Jacob R., (2013). **Correlated Expression of Galectin-3 with the tumour suppressor gene CEACAM1 in human clear cell renal cell carcinoma.** *Manuskript in Vorbereitung*

Straube T., Bänfer S., Jacob R., (2013). **Endocytosis of Galectin-3 by 3D GSDIM.** *Manuskript in Vorbereitung*

Straube T., Elli A., Schué A., Jacob R. (2011). **GSDIM: ein pointillistischer Blick auf die Zelle.** *Biospectrum*

Straube T., Elli A., Greb C., Hegele A., Elsässer HP., Delacour D. und Jacob R. (2011). **Changes in the expression and subcellular distribution of galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma.** *J Exp Clin Cancer Res*

Schneider D., Greb C., Koch A., Straube T., Elli A., Delacour D. und Jacob R. (2010). **Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells.** *Eur J Cel Biol*

7.4 Poster

Straube, T., von Mach, T., Greb, C. und Jacob, R. **Micromembrane interactions of Galectin-3.** *Annual Meeting of the American society for Cell Biology, Denver, USA, 2011*

Straube, T., von Mach, T., Greb, C. und Jacob, R. **Switch of membrane domains: galectin-3 can do both.** *Student-organized International Symposium of the DFG Research Training Group 1216, Marburg, 2011*

Schneider D., Greb C., Koch A., Straube T., Elli A., Delacour D. und Jacob, R. **Schuttling of galectin-3 between lipid raft-indepemdent exocytic and lipid raft-dependent endocytic pathways.** *International Symposium for PhD Students on Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg, 2010*

Schneider D., Greb C., Koch A., Straube T., Elli A., Delacour D. und Jacob, R. **Schuttling of galectin-3 between lipid raft-indepemdent exocytic and lipid raft-dependent endocytic pathways.** *Annual Meeting of the American society for Cell Biology, San Diego, USA, 2009*

7.5 Verzeichnis der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Bastians, Bauer, Becker, Daut, del Ray, Eilers, Elsässer, Feuser, Garn, Garten, Grzeschick, Gudermann, Haselik, Jacob, Koolman, Krebber, Löffler, Lill, Liss, Lohoff, Lüers, Maisner, Moll, Mühlenhoff, Müller, Müller-Brüsselbach, Renkawitz-Pohl, Röhm, Röper, Renz, Schäfer, Schrader, Suske, Weihe und Westermann.

7.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank...

... Prof. Dr. Ralf Jacob für die Bereitstellung des interessanten Themas, der benötigten Mittel, die Betreuung während der Laborarbeit und die hilfreichen Ratschläge und Diskussionen.

... PD Dr. Axel Hegele für die Bereitstellung der Patientenproben, Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer für die Bereitstellung von Antikörpern, Dr. Stefan Baumeister für die Unterstützung bei den Massenspektrometrischen Analysen und Prof. Dr. Hakon Leffler für den Aufenthalt in seinem Labor in Schweden und die Unterstützung bei den Fluoreszenzpolarisationsstudien.

...den derzeitigen und ehemaligen Labormitgliedern der AG Jacob (Waltraud Ackermann, Martina Dienst, Dominik Schneider, Christoph Greb, Ksenia Astanina, Sabrina Zink, Tobias von Mach, Marcel Reeh, Sebastian Bänfer, Christian Schink, Florian Hoff, Ellena Hönig, Katharina Fritsch, Alexandra Elli, Patrick Wenzel und Matthias Eilbrecht) für die herzliche Aufnahme in ihrer Mitte. Ihr habt mir fünf unvergessliche Jahre mit viel leckerem Kuchen beschert.

... Waltraud Ackermann und Martina Dienst, die mich tatkräftig im Labor unterstützt haben.

...Dominik Schneider, Christoph Greb, Sabrina Zink, Ksenia Astanina, Tobias von Mach und Marcel Reeh für die gute Büroatmosphäre, ihr stets offenes Ohr und so manche geistreichen Kommentare.

...Dominik Schneider, Marcel Reeh und Kathrin Bolte für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

...Christoph Greb, Dominik Schneider und Tobias von Mach für unvergessliche Aufenthalte in Kalifornien und Colorado. Neben Riesensandwiches, langen Spaziergängen über die Golden Gate Bridge und in eisiger Kälte, bis hin zu verschwundenen Hotels und die Entstehung von Dominiks zweitem Geburtstag.

...Victoria Paul, Nicole Rietzschel und Marta Uzarska für so manche lustige Feierabendgestaltung, ein unvergessliches Mädchenwochenende und das regelmäßige Cafe Vetter Frühstück.

...Marcel Reeh, Dominik Schneider, Christoph Greb, Holger Webert, Christian Schink, Victoria Paul, Nicole Rietzschel, Marta Uzarska, Kathrin Bolte und Monika Krämer für die schöne Zeit auch neben der Arbeit. Es war immer lustig mit euch!

...der gesamten Zellbiologie für die großartige Atmosphäre und besonders den im Hintergrund mitwirkenden Personen Volkwin Kramer, Gisela Lesch und Ralf Rößer.

...meiner Familie für die Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Doktorandenzeit, auch wenn ihr vermutlich nie verstanden habt, was ich eigentlich genau mache.

...der Deutschen Forschungsgemeinschaft in Form des Sonderforschungsbereich 593 und dem Graduiertenkolleg 1216 für die Förderung und finanzielle Unterstützung.

...meinen Freunden in und um Marburg, ohne die meine Studien- und Doktorandenzeit nur halb so schön gewesen wäre.

...meinem Freund Marcel für die Unterstützung besonders in der letzten heißen Phase. Danke, dass du immer für mich da bist!